

AUS DEM INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE  
KOMMISSARISCHE LEITUNG PROFESSOR CZUBAYKO

DES FACHBEREICHS MEDIZIN DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG



# Signalwege des TSH-Rezeptors

## $G_{q/11}$ -vermittelte Regulation von Metallothioninen in Schilddrüsenkarzinomzellen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität vorgelegt von

**CHRISTER MATTHIAS BÄCK**

aus Schweinfurt

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 24.09.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. T. Gudermann
Korreferent:	Prof. Dr. G. Aumüller

**Till mina föräldrar**

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>2. Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>3.1. Vorkommen des TSHR</b>	<b>6</b>
<b>3.2. Funktion des TSHR</b>	<b>7</b>
3.2.1. Physiologische Funktion des TSHR im thyreotropen Regelkreis	7
3.2.2. Funktion des TSHR als Rezeptor seiner Zelle	9
3.2.2.1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)	9
3.2.2.2. Signaltransduktion des TSHR	10
3.2.3. Pathophysiologische Funktion des TSHR	12
<b>3.3. Struktur des TSHR</b>	<b>13</b>
3.3.1. Mutationen des TSHR an Position Y601	17
<b>3.4. Metallothionine</b>	<b>18</b>
<b>3.5. Fragestellung</b>	<b>20</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Geräte</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>23</b>
4.2.1. Chemikalien	23
4.2.2. Enzyme, Größenstandards und Versuchsskits	24
4.2.3. Primer	24
4.2.4. Antikörper	25
<b>4.3. Zellkultur</b>	<b>25</b>
4.3.1. Kultivierung von Zellen	26
4.3.2. Kryokonservierung von Zellen	26
<b>4.4. RNA Isolierung</b>	<b>27</b>
4.4.1. Durchführung	27
4.4.2. Die Agarose-Gel-Elektrophorese für RNA	27
<b>4.5. RT-PCR</b>	<b>28</b>
4.5.1. Synthese der cDNA	28
4.5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
4.5.3. Quantitative PCR (Real-Time Detection PCR)	29
4.5.4. Funktionsweise	30



4.5.4.1. Berechnungen	32
<b>4.6. Western Blot</b>	<b>33</b>
4.6.1. SDS Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	33
4.6.2. Immunoblotting	34
<b>4.7. Mikroskopie</b>	<b>35</b>
4.7.1. Probenvorbereitung und Immuncytochemie (ICC)	36
4.7.2. Fluoreszenzmikroskopie	36
4.7.3. Konfokale Laserscanmikroskopie (CLSM)	37
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>38</b>
<b>5.1. Regulation der MT-1-Transkription in FTC-133-Zellen</b>	<b>38</b>
5.1.1. MT1x und MT1g nach TSH Stimulation	38
5.1.2. Proteinkinase C-abhängige MT1-Regulation	45
<b>5.2. Regulation der MT-Proteinexpression in FTC-133-Zellen</b>	<b>48</b>
5.2.1. TSH-abhängige MT-Induktion	48
5.2.2. Subzelluläre Verteilung von MT	49
<b>5.3. Der JAK/STAT-Signalweg in Schilddrüsenkarzinomzellen</b>	<b>54</b>
<b>5.4. MT in primären Schilddrüsenzellen</b>	<b>56</b>
<b>6. Diskussion</b>	<b>61</b>
<b>6.1. Expression von MT in der Schilddrüse</b>	<b>63</b>
6.1.1. Transkriptionelle Regulation von MT	64
6.1.2. Translationelle Regulation von MT	65
<b>6.2. MT und oxidativer Stress in der Schilddrüse</b>	<b>66</b>
6.2.1. Regulation von MT	67
<b>6.3. Abhängigkeit der MT-Induktion vom JAK/STAT-Pathway</b>	<b>70</b>
<b>6.4. Ausblick</b>	<b>74</b>
<b>7. Literatur</b>	<b>75</b>
<b>8. Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	<b>86</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>87</b>
<b>10. Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>88</b>

## **2. Zusammenfassung**

Metallothionine (MT) sind cysteinreiche intrazelluläre Proteine, für die eine zytoprotektive Wirkung beschrieben wurde, da sie Zellen gegen Schwermetallionen und oxidativen Stress schützen. In früheren Untersuchungen wurde die Expression von Metallothioninen in normalen sowie neoplastischen Schilddrüsenzellen nachgewiesen. Die Regulation von MT in Schilddrüsenzellen ist jedoch weitestgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von MT nach Thyreotropin-Stimulation in humanen Schilddrüsenkarzinomzellen (FTC-133) und primären Schilddrüsenzellen (SD-191) untersucht. Mittels RT-PCR konnte nach TSH-Stimulation eine Dosis-abhängige Induktion der MT1-mRNA nachgewiesen werden. Um den Signalweg, der zu dieser vermehrten MT1-Transkription führt, genauer zu charakterisieren, wurden Schilddrüsenkarzinomzellen (FTC-133 Y601H) untersucht, welche mit einem mutierten TSH-Rezeptor (TSHR) transfiziert waren, der nicht in der Lage ist, das  $G_{q/11}$ -Protein zu binden. In diesen Zellen führt eine TSH-Stimulation zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration, wie sie auch in Zellen mit nicht-mutiertem TSHR zu finden ist. Ein Anstieg von Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) bleibt in den Zellen mit dem mutierten TSHR jedoch aus. Interessanterweise zeigte sich in FTC-133 Y601H Zellen keinerlei TSH-abhängige MT1-Induktion, was auf eine cAMP-unabhängige, jedoch  $G_{q/11}$ -abhängige Regulation von Metallothioninen schließen lässt. Dieses Ergebnis wurde in weiteren Untersuchungen durch die Tatsache untermauert, dass in Schilddrüsenzellen mit intaktem TSHR die Induktion von MT durch Inhibition der Proteinkinase C (PKC) verhindert werden konnte, während sie durch direkte Stimulation der PKC mit einem Phorbol ester gesteigert wurde. Weiter wurde die TSH-abhängige MT1-Expression auf Protein-Niveau mit Hilfe eines MT1-spezifischen Antikörpers überprüft. Auch hier wurde eine Hochregulation von MT1-Protein nach TSH-Stimulation in FTC-133-TSHR Zellen gefunden, welche im Vergleich dazu in FTC-133 Y601H Zellen wiederum fehlte.

Unbekannt ist nun, welche Mechanismen zwischen der PKC-Aktivierung auf der einen Seite und der endgültigen Translation des MT1-Proteins auf der anderen Seite stehen. Hierfür wurde das Augenmerk auf die PKC abhängige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT<sup>1</sup> gerichtet, welcher u.a. als MT-Transkriptionsfaktor beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des STAT-Proteins in FTC-133 Zellen  $G_{q/11}$ -

---

<sup>1</sup> Signal transducers and activators of transcription

abhängig durch den TSHR reguliert wird. Diese Ergebnisse konnten in einem zweiten Zellsystem, primären Thyreozyten (SD-191), reproduziert werden. Diese SD-191 Zellen exprimieren endogen einen funktionstüchtigen TSHR. So kann man die Aktivierung von MT durch den TSHR in Schilddrüsenzellen nach heutigem Kenntnisstand wie in Abbildung 1 beschrieben zusammenfassen.

Somit konnte hier in einem Zellsystem, welches physiologischer Weise unter hohem oxidativen Stress steht, eine rezeptorvermittelte Induktion von einem antioxidativ wirkenden Protein genauer beschrieben werden. Interessant ist hierbei, dass der TSHR mit Hilfe von unterschiedlichen G-Proteinen oxidativ und antioxidativ wirkende Mechanismen gleichzeitig zu aktivieren scheint. Die hier vorgestellte Charakterisierung eines  $G_{q/11}$ -abhängigen Signalweges des TSHR zur Regulation von MT fügt den cAMP-unabhängigen Signalwegen des TSHR weitere Komplexität hinzu.

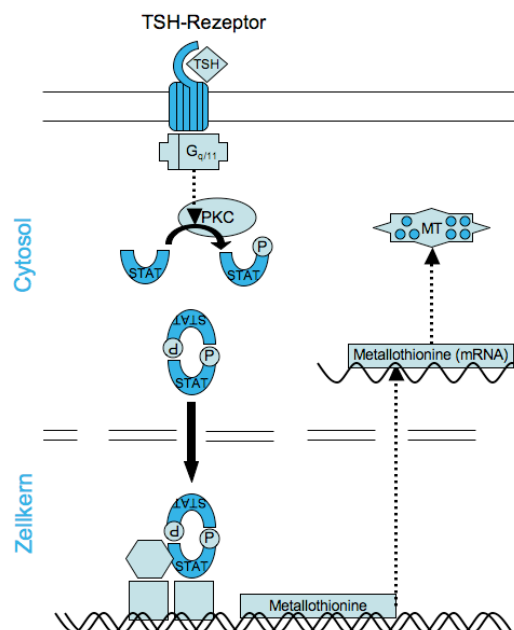


Abbildung 1: Schaubild zur MTaktivierung durch TSH in Schilddrüsenzellen, inkl. Translation von MT-mRNA zum MT-Protein und STAT-Aktivierung (PKC, Proteinkinase C; STAT, Signal transducers and activators of transcription; TSH, Thyroid-stimulating hormone)

MT are cystein-rich intracellular proteins which exert anti-apoptotic effects by protecting cells against oxidative stress and heavy metal ions. Previously, expression of MT in normal and neoplastic thyroid tissue has been demonstrated. However, the thyroidal regulation of MT expression is widely unsettled.

Thus, we investigated the expression of MT isoform 1 in human thyroid carcinoma cells (FTC-133-TSHR) and in primary human thyrocytes (SD-191) upon stimulation with thyrotropin (TSH). Using quantitative RT-PCR we found that TSH led to a dose-dependent increase in MT1 mRNA levels in these cells. To further characterize the signaling pathway involved in MT1 induction we investigated thyroid carcinoma cells expressing a mutated TSH receptor incapable to couple to  $G_{q/11}$  proteins (FTC-133 Y601H cells). In these cells, TSH still led to a marked increase in intracellular cAMP levels whereas an increase in inositol phosphates was completely absent. Interestingly, TSH did not induce MT1 in these cells, giving evidence that regulation of MT1 was cAMP-independent but dependent on  $G_{q/11}$ -coupling. This finding was further verified by the fact that TSH-promoted induction of MT1 in FTC-133-TSHR cells was blocked by inhibitors of protein kinase C (PKC), whereas activation of PKC by treatment with phorbol esters mimicked the effect of TSH. Finally, we investigated changes in MT1 protein levels. Immunoblots and immunocytochemistry with MT1 specific antibodies revealed a TSH-induced up-regulation of MT1 in FTC-133-TSHR cells whereas no effect of TSH occurred in FTC-133 Y601H cells.

In addition we turned our attention to the PKC-dependent phosphorylation of the transcription factor STAT<sup>1</sup>. With the help of immunoblots we could find a correlation between the TSH-dependent phosphorylation of STAT through the PKC and the induction of MT1. To summarize the induction of MT1 in human thyroid cells through the TSHR is shown in fig. 1.

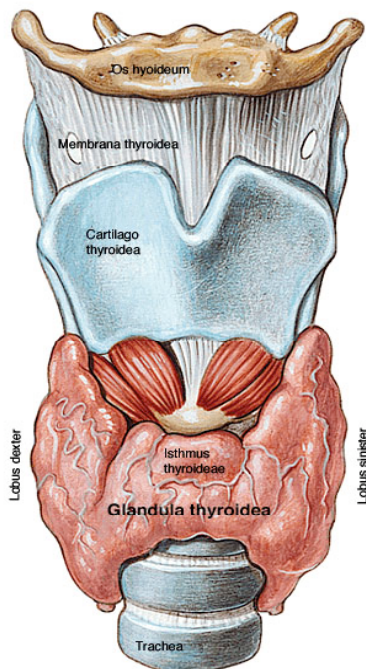
Thus we were able to describe a receptor-mediated induction of an antioxidant protein in a cell, which is physiologically under oxidative stress. Interestingly, the TSH-receptor seems to activate oxidative and antioxidative mechanism simultaneously via different G-proteins. The finding of  $G_{q/11}$ -dependent regulation of MT1 by TSH adds further complexity to possible cAMP-independent functions of the TSH receptor.

### 3. Einleitung

Ausgangspunkt dieser vorliegenden Arbeit waren Versuche von Novak et al. zur TSH-abhängigen Genexpression in Schilddrüsenkarzinomzellen mit intakter und inhibierter  $G_{q/11}$ -vermittelter Signaltransduktion des TSH Rezeptors. Hierauf aufbauend wurde nun versucht, die Regulation bestimmter Proteine in Abhängigkeit von TSH und  $G_{q/11}$ -abhängigen Signalwegen in Schilddrüsenepithelzellen zu charakterisieren. Da der TSHR (TSHR) der Ausgangspunkt dieser Fragestellung ist, soll im Folgenden zunächst näher auf Vorkommen, Funktion und Struktur des TSHR eingegangen werden.

#### 3.1. Vorkommen des TSHR

Klassischerweise wurde angenommen, dass der TSHR nur in Epithelzellen der Schilddrüse (Thyreozyten) vorkommt. Mittlerweile ist der TSHR u.a. aber auch in Monozyten, Astrozyten, Osteozyten und anderen Zellen identifiziert worden, wobei die funktionelle Bedeutung des TSHR in diesen extrathyreoidalen Zellen noch nicht geklärt ist.



Der Hauptexpressionsort des TSHR, die Schilddrüse (Glandula Thyroidea), ist eine vor der Trachea liegende endokrine Drüse des Menschen (Abbildung 2). Sie produziert die Schilddrüsenhormone Thyroxin (T<sub>4</sub>), Trijodthyronin (T<sub>3</sub>) und Kalzitonin und ist mit diesen Hormonen am Grundumsatz stoffwechselaktiver Organe sowie am Kalziumhaushalt des Körpers beteiligt. Das beim Gesunden 25-30 g schwere Organ ist U-förmig und besitzt einen Lobus dexter und Lobus sinister, welche über den Isthmus thyroideae verbunden sind. Die Schilddrüse befindet sich unterhalb des Schildknorpels (Cartilago thyroidea), und liegt dem Ringknorpel (Cartilago cricoidea) auf (Schiebler, 2005).

Abbildung 2: Die Schilddrüse des Menschen; modifiziert nach Sobotta (Sobotta, 2005)

Die Schilddrüse wird durchsetzt von bis zu 0,9 mm großen, rundlichen Schilddrüsenfollikeln. Die Follikel werden von einem einschichtigen Epithel ausgekleidet, und beinhalten ein homogenes Kolloid. Dieses Kolloid besteht hauptsächlich aus Thyreoglobulin, einem

Glykoprotein, welches als Speicherform der Schilddrüsenhormone dient. Jedes Thyreoglobulinmolekül enthält ungefähr 115 Tyrosinreste, welche im Lumen der Follikel iodiert werden, und so als Vorläufer für Triiodthyronin ( $T_3$ ) und Tetraiodthyronin (Thyroxin,  $T_4$ ) dienen (Rang, 2003).  $T_3$  und  $T_4$  werden über einfache Diffusion in das Blut abgegeben und erhöhen auf vielfältige Weise den sog. Grundumsatz des Organismus: z. B. durch Erhöhung des  $O_2$ -Verbrauchs, des Energieumsatzes und der Wärmeproduktion (Schiebler, 2005; Lüllmann-Rauch, 2006). Die Bindung von  $T_4$  an Plasmaproteine ist stärker als die von  $T_3$ . So gibt die Schilddrüse hauptsächlich  $T_4$  ins Blut ab (zirka 50 nmol  $T_3$  und 110 nmol  $T_4$  pro Tag), obwohl  $T_3$  eine fünfmal höhere biologische Aktivität besitzt. Deswegen wird an der Zielzelle  $T_4$  in das aktivere  $T_3$  durch die selenabhängige 5'-Deiodase überführt (Kelly, 2000; Klinker *et al.*, 2005).

### **3.2. Funktion des TSHR**

Der TSHR spielt eine essentielle Rolle in der Funktion der Schilddrüse und ihrem thyreotropen Regelkreis (Abbildung 4). So kommt die Produktion von  $T_3/T_4$  sowie der gesamte thyreotrope Regelkreis zum Erliegen, wenn der TSHR aufgrund von inaktivierenden Mutationen einen Funktionsverlust zeigt.

#### **3.2.1. Physiologische Funktion des TSHR im thyreotropen Regelkreis**

Der entscheidende Stimulus für die Synthese und Ausschüttung der Schilddrüsenhormone<sup>2</sup> ist die Aktivierung des TSHR durch die Bindung des Liganden TSH. TSH ist ein komplexes Glykoproteinhormon (GPH) mit einer molekularen Masse von 28-30 kDa und einer Halbwertszeit von etwa einer Stunde (Abbildung 3). Es besteht aus 211 Aminosäuren in zwei Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheit ist identisch mit den  $\alpha$ -Untereinheiten der Glykoproteinhormone LH (Lutropin), FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und HCG (humanes Choriogonadotropin), welche ebenfalls von der Adenohypophyse ausgeschüttet werden. Die  $\beta$ -Untereinheit ist hingegen spezifisch für TSH (Giudice *et al.*, 1979; Vamvakopoulos *et al.*, 1979).

---

<sup>2</sup> Die Bezeichnung „Schilddrüsenhormone“ bezieht sich im weiteren Text lediglich auf  $T_3$  und  $T_4$

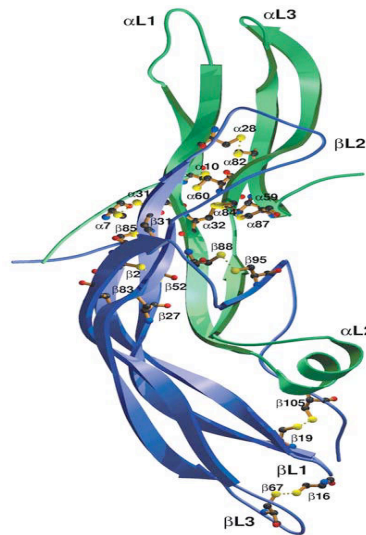


Abbildung 3: Strukturmodell des humanen Thyreotropin (hTSH); die  $\alpha$ -Kette ist grün, die  $\beta$ -Kette blau gefärbt (Nunez Miguel *et al.*, 2004)

Die bedarfsgerechte Bereitstellung von TSH wird durch den thyreotropen Regelkreis gesteuert (Abbildung 4). Der Hypothalamus bildet das erste Glied in dieser Kette. Seine neurosekretorischen Neuronen bilden auf verschiedene Reize hin TRH (Thyreotropin-releasing Hormon), welches in der Eminentia Mediana in einem Kapillarplexus (Primärplexus) ausgeschüttet wird. Von hier aus wird das TRH über das Blut in Portalgefäße zum sekundären Kapillarplexus im Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) transportiert. Dort liegen thyreotrope Zellen, welche histologisch zu der Gruppe der basophilen Zellen der Adenohypophyse gehören und den G-Protein gekoppelten TRH-Rezeptor exprimieren. Diese Zellen antworten auf die Stimulation durch TRH mit einer Sekretion von Thyreotropin (TSH). Die TSH-Sekretion kann jedoch von anderen Hormonen (Somatostatin und Dopamin) und Cytokinen (z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) inhibiert werden (Nussey *et al.*, 2001; Fliers *et al.*, 2006).

Nachdem TSH über den großen Kreislauf zur Schilddrüse gelangt ist, bindet es dort an den TSHR der Follikelepithelzellen. Durch diese Bindung werden die Epithelzellen stimuliert und Schilddrüsenhormone freigesetzt. Pro Tag werden ungefähr 100  $\mu$ g Schilddrüsenhormone freigesetzt, wobei der größte Teil der Hormone als T<sub>4</sub> (90 %) ausgeschüttet wird (Silbernagel, 1991).

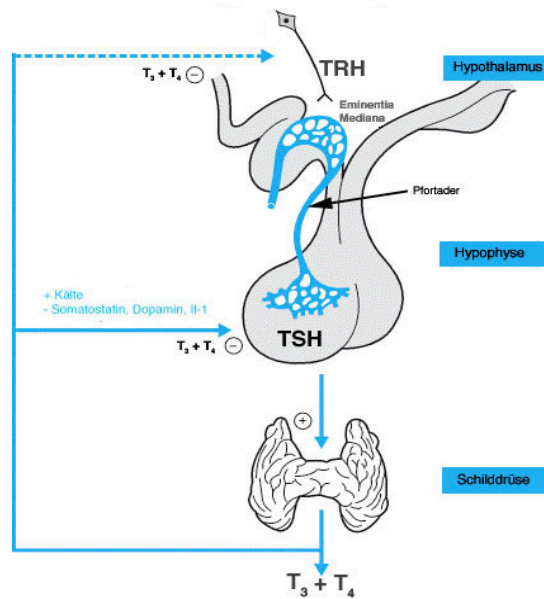


Abbildung 4: Hypothalamus-Hypophysen-Thyreoidea-Regelkreis; modifiziert nach Nussey u. Whitehead (Nussey & Whitehead, 2001)

#### 3.2.2. Funktion des TSHR als Rezeptor seiner Zelle

Beim Thyreozyten dient der TSHR vor allem als Schnittstelle, die das Zellinnere mit der Außenwelt verbindet. Der TSHR reguliert hierbei eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie Proliferation, Iodidaufnahme, Hormonsynthese und -ausschüttung. Hiefür bedient sich der TSHR einer Vielzahl von intrazellulären Signalwegen und molekularen Mechanismen. Bevor jedoch nun genauer auf die Signalweiterleitung des TSHR eingegangen wird, soll zunächst das allgemeine Prinzip der Signaltransduktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) dargestellt werden.

##### 3.2.2.1. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Die GPCR bilden eine der größten Proteinfamilien des Menschen. Bis zu einem Prozent der menschlichen Gene kodieren für diese Proteine (Alberts, 2002). Alle GPCR arbeiten nach einem ähnlichem System: Die Bindung eines extrazellulären Liganden an den GPCR verursacht eine definierte Konformationsänderung im Rezeptorprotein, worauf sich seine Bindungseigenschaften einem intrazellulären heterotrimeren G-Protein gegenüber ändern (Conklin *et al.*, 1993; Neer, 1995; Bourne, 1997a; Bourne, 1997b; Wess, 1997). Diese heterotrimeren G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -Untereinheit und einem  $\beta\gamma$ -Komplex und liegen an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Sie binden je nach Aktivitätszustand (gesteuert vom GPCR) an der  $\alpha$ -Untereinheit GDP, bzw. GTP (Conklin & Bourne, 1993; Clapham *et al.*, 1997; Wess, 1998).



Die GPCR bestehen in der Regel aus einer einzelnen Peptidkette mit bis zu 1100 Aminosäuren und haben eine charakteristische dreidimensionale Struktur. Sie bilden sieben  $\alpha$ -Transmembranhelices (TM I-VII) mit drei intrazellulären (I1-I3) und drei extrazellulären (E2-E4) Schleifen (Abbildung 6) (Strader *et al.*, 1994; Wess, 1998).

G-Proteine werden üblicherweise nach ihrer  $\alpha$ -Untereinheit benannt. Zurzeit kennt man bis zu 27 verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten, welche nach Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz in vier Hauptgruppen unterteilt werden:  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  und  $G_{12/13}$  (Simon *et al.*, 1991; Conklin & Bourne, 1993). Die  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten beeinflussen jeweils unterschiedliche Effektormoleküle in der Zelle. So inhibieren zum Beispiel  $G_{i/o}$ -Proteine über ihre  $\alpha$ -Untereinheit eine Reihe von Enzymen aus der Familie der Adenylatcyclasen, welche die Synthese des Signalmoleküls cAMP katalysieren. cAMP beeinflusst zahlreiche Zellfunktionen, wie z.B. den Energiestoffwechsel, die Zellteilung und die Zellentwicklung. Auch die Sekretion von TRH aus dem Hypothalamus unterliegt der Kontrolle von cAMP. (Wess, 1998).

Um die physiologischen Aufgaben eines bestimmten GPCR zu beschreiben, identifiziert man oft zunächst die G-Proteine, mit denen jener GPCR hauptsächlich agiert. Studien haben gezeigt, dass ein GPCR meist eine bestimmte Gruppe von G-Proteinen bevorzugt (Hedin *et al.*, 1993; Milligan *et al.*, 1995; Raymond, 1995; Gudermann *et al.*, 1996; Gudermann *et al.*, 1997).

#### **3.2.2.2. Signaltransduktion des TSHR**

Nach Aktivierung des TSHR durch TSH und der Kopplung verschiedener G-Proteine folgt eine Signaltransduktionskaskade im Inneren der Zelle. Resultat sind die Stimulation verschiedener Prozesse der Schilddrüsenhormonsynthese und -freisetzung sowie ein vermehrtes Wachstum der Schilddrüse (Nussey & Whitehead, 2001). Die meisten Zellreaktionen auf den TSH-Stimulus werden vermutlich über  $G_s$ - und  $G_{q/11}$ -Protein vermittelt (Abbildung 5) (Williams *et al.*, 2003).

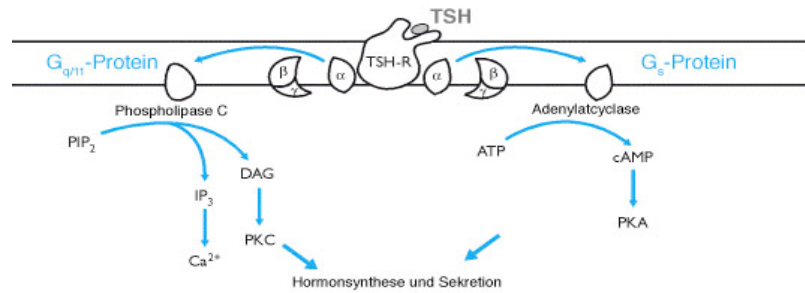


Abbildung 5: TSHR und seine G<sub>s</sub>- und G<sub>q/11</sub>-Protein abhängigen Signalwege; modifiziert nach Nussey u. Whitehead (Nussey & Whitehead, 2001)

#### *G<sub>s</sub>-Protein vermittelter Signalweg*

Koppelt ein G<sub>s</sub>-Protein an den C-Terminus des TSHR wird die  $\alpha$ -Untereinheit des G<sub>s</sub>-Proteins abgespalten. Diese  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert nun die membranständige Adenylatcyclase, welche im Cytosol befindliches Adenosyltriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosyltriphosphat (cAMP) umwandelt (Abbildung 5) (Simon *et al.*, 1991). Das gebildete cAMP wirkt als sekundärer Botenstoff in der Zelle.

Zu den cAMP-vermittelten Prozessen in Schilddrüsen-Epithelzellen gehören:

- die Aufnahme von Iodionen durch die Follikelzellen mittels Stimulation der Transkription des Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symportergens
- Die Aktivierung der Gene für Thyreoglobulin und Thyreoperoxidase
- Die vermehrte Sekretion von Thyreoglobulin in das Follikellumen
- Die Endozytose und Proteolyse von Thyreoglobulin
- Die Steigerung der Sekretion von T3 und T4
- Die Erhöhung der Schilddrüsenperfusion (Williams & Larsen, 2003)

#### *G<sub>q/11</sub>-Protein vermittelter Signalweg*

Koppelt nun ein G<sub>q/11</sub>-Protein an den C-Terminus des TSHR wird auch hier die  $\alpha$ -Untereinheit abgespalten, welche nun die Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) aktiviert. Das membranständige Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>) wird von der PLC $\beta$  zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1, 4, 5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) hydrolysiert (Rhee, 2001) (Gilman, 1987).

Das im Cytosol gelöste IP<sub>3</sub>, ein hydrophiler phosphatierter Zuckeralkohol, bindet als nächstes an seinen Rezeptor, welcher in der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) lokalisiert ist. Dieser Rezeptor gehört zu den ligandengesteuerten Kalziumkanälen und öffnet sich nach Ligandenbindung. So verursacht IP<sub>3</sub> durch Bindung an seinen Rezeptor einen Kalziumeinstrom aus dem RER in das Cytosol. Der

Konzentrationsanstieg der Kalziumionen kann nun viele verschiedene Prozesse initiieren: z.B. Sekretion, Membranpolarisation, Enzymaktivierung etc (Berridge, 1987; Hubbard *et al.*, 2006).

Das lipophile DAG verbleibt in der inneren Zellmembran und aktiviert dort die Proteinkinase C (PKC). Die aktivierte PKC phosphoryliert nun verschiedene Proteine an Serin- und Threoninresten, welche durch diese Phosphorylierung selbst aktiviert oder deaktiviert werden. (Kikkawa *et al.*, 1989; Nishizuka, 1995; Hubbard & Hepler, 2006).

Zu den PLC-vermittelten Prozessen gehören in der Schilddrüse:

- Die Generierung von  $H_2O_2$
- Die Iodierung der Tyrosinreste im Thyreoglobulin
- Der Iod-Efflux (Williams & Larsen, 2003)

#### **3.2.3. Pathophysiologische Funktion des TSHR**

##### *Hyperthyreose, die Basedowsche Krankheit*

Die Bedeutung des TSHR bei der Regulation der Aktivität der Schilddrüse wird am Beispiel des Morbus Basedows deutlich. Jene häufigste Form der Hyperthyreose wurde nach ihrem deutschen Erstbeschreiber Carl Adolf von Basedow benannt (1858). Bei dieser Autoimmunkrankheit binden aktivierende Autoantikörper an den TSHR. Durch die Antikörperbindung wird der TSHR überstimuliert und die Schilddrüse reagiert sowohl mit Hormonproduktion und –sekretion, als auch mit vermehrtem Wachstum. Symptome dieser Krankheit sind die sogenannte Merseburger Trias (Struma, Tachykradie, Exophthalmus), prätibiale Myxödeme und Gewichtsverlust (Renz-Polster *et al.*, 2004).

##### *Hypothyreose, Hashimoto-Thyreoiditis*

Eine der häufigsten Ursachen für eine primäre Hypothyreose ist die Hashimoto-Krankheit. Bei dieser Autoimmunkrankheit findet man eine durch T-Zellen gesteuerte subakut-chronische Thyreoiditis mit Autoantikörpern gegen schilddrüsenspezifische Antigene (TPO-AK, Tg-AK). Symptome sind knotig-diffuses Struma (lymphozytäre Infiltrate), Erschöpfbarkeit, Antriebsschwäche und bei Kindern evtl. eine Störung der geistigen Entwicklung sowie Störung der Skelettbildung (Verzögerung des Epiphysenschlusses) (Nussey & Whitehead, 2001; Dannen, 2002).

##### *Krebserkrankungen der Schilddrüse*

Der Mensch benötigt ca. 200 µg Jod pro Tag für die adäquate Produktion von Schilddrüsenhormonen. Die durchschnittliche Jodzufuhr in Deutschland liegt jedoch bei

unter 100 µg/d. Dieser Jodmangel verursacht eine Aktivierung intrathyroidaler Wachstumsfaktoren (wie „epidermal growth factor“ und „insulin-like growth factor“) und kann so zur häufigsten Erkrankung der Schilddrüse, der euthyreoten Struma, führen (Eszlinger *et al.*, 2001).

Mit einer Inzidenz von ca. 3/100.000 sind Malignome der Schilddrüse die häufigsten endokrinen Neoplasien. Hierzu zählen Karzinome der Follikelepithelzellen, welche nach ihrem histologischen Bild in papilläre und follikuläre Erscheinungsformen unterteilt werden. Zusätzlich gibt es bei der Schilddrüse von den C-Zellen ausgehende medulläre Schilddrüsenkarzinome, welche Kalzitinin produzieren können (Renz-Polster & Aries, 2004).

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom (PTC) ist die häufigste primäre Neoplasie der Schilddrüse (50-60 %) und wächst oft multifokal. Sie bildet fingerförmige Ausstülpungen mit einem fibrovaskulären Kern und metastasiert vorwiegend lymphogen. Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (FTC) hingegen metastasiert vorwiegend hämatogen. Es kommt bei Frauen und in Gebieten mit Jodmangel häufiger vor (insg. 20-30 % der Schilddrüsenneoplasien). Faktoren, welche die Entstehung von Karzinomen begünstigen, sind genetischer Natur (Deletionen und Dislokationen im p-Arm des Chromosom 3) oder auch ionisierende Strahlung (Williams & Larsen, 2003).

Der genaue Signalweg, über den Karzinome ihren andauernden Wachstumsstimulus erfahren, ist nicht endgültig geklärt. Die Annahme, dass eine ständige Stimulation durch cAMP ausreicht, um ein undifferenziertes, enthemmtes Wachstum zu verursachen, trifft offensichtlich nicht zu (Vallar, 1996; Suarez, 2000; Bossis *et al.*, 2004). Es scheint im Gegenteil so zu sein, dass diese Dauerstimulation mit cAMP die Zellen in einem differenzierten Stadium hält (Arturi *et al.*, 2003). Die weitere Beteiligung von Mediatoren wie Ras und pax8 wird aktuell diskutiert (Kroll, 2004; Hunt, 2005).

### **3.3. Struktur des TSHR**

Der humane TSHR gehört zu der großen Superfamilie der G-Protein-koppelnden Rezeptoren (Vassart *et al.*, 1992; Misrahi *et al.*, 1994; Gudermann *et al.*, 1995). Während der TSHR mit seiner großen extrazellulären Domäne das Glykopeptidhormon TSH bindet, hat seine intrazellulären Domäne die Fähigkeit alle vier G-Proteinfamilien ( $G_s$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{12/13}$ ) zu binden und zu aktivieren (Allgeier *et al.*, 1994; Laugwitz *et al.*, 1996). Das TSHR-Gen liegt

auf Chromosom 14q13 und ist in 10 Exons unterteilt. Dabei enthalten die ersten neun Exons die Information für die extrazelluläre Domäne, während Exon 10 für die sieben transmembranen Segmente und den intrazellulären Teil des TSHR kodiert (Abbildung 6) (Nagayama *et al.*, 1992). Im Körper werden zwei verschiedene Formen des TSHR exprimiert. Eine Form besteht aus einer durchgehenden Polypeptidkette, eine andere ist aufgeteilt in zwei Untereinheiten (A und B), welche über Disulfidbrücken verbunden sind (Gross *et al.*, 1991). Diese zwei Untereinheiten (A und B) entstehen durch posttranslationale, intramolekulare Spaltung. Dabei wird ein 50 Aminosäuren großes C-Peptid von der ursprünglichen Polypeptidkette abgeschnitten. Diese beiden Expressionstypen des TSHR unterscheiden sich jedoch nicht in ihren grundsätzlichen Eigenschaften (Kajita *et al.*, 1985; Wonerow *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2002).

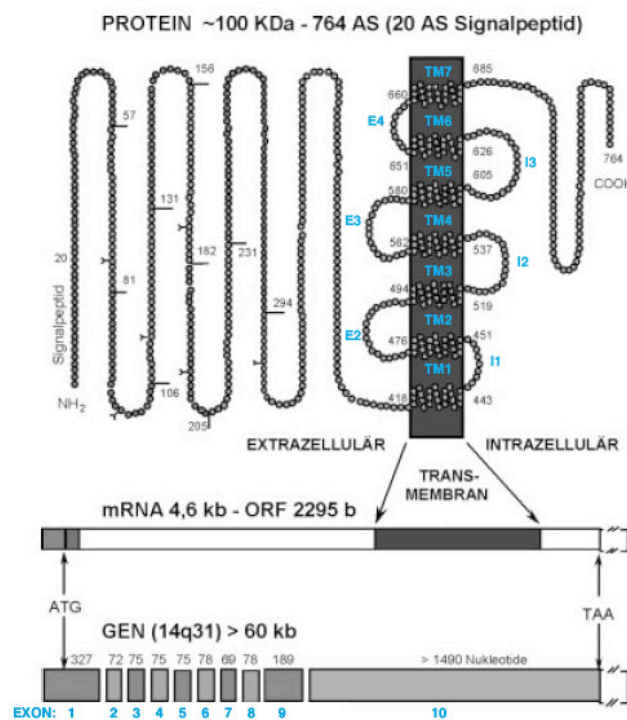


Abbildung 6: TSHR; Struktur und Organisation des TSHR Gens; modifiziert nach Janssen (Janssen *et al.*, 2003)

Charakteristisch für den TSHR, wie auch für die ihm verwandten LH- und FSH-Rezeptoren, ist eine große extrazelluläre Domäne (Misrahi *et al.*, 1992; Probst *et al.*, 1992; Misrahi *et al.*, 1994) mit Regionen, die viele Leucin-Wiederholungen (LRR, „leucin-rich repeats“) aufweisen (Gross *et al.*, 1991; Kajava *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1996). Diese LRR-Region teilt sich auf in neun alternierende Abfolgen von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern, wobei die  $\beta$ -Faltblätter die entscheidende Region für die Ligandenbindung sind. Die Ektodomäne des TSHR stellt sich wahrscheinlich mit seinen neun LRR-Regionen leicht gekrümmt dar (Nunez

Miguel *et al.*, 2004). Seine  $\alpha$ -Helices sind dabei nach außen gerichtet, während die  $\beta$ -Faltblätter der LRR-Region nach innen zeigen (Abbildung 7) (Gudermann *et al.*, 2005). Die Nicht-Leucin-Aminosäuren in den  $\beta$ -Faltblättern dieser Region des TSHR dienen der TSH-Ligandenbindung (Kobe *et al.*, 1994). Als Verbindungsstück zwischen dieser extrazellulären Domäne und der transmembranösen Domäne des TSHR dient die flankierende CFR (cysteinreiche Region) (Braun *et al.*, 1991; Gross *et al.*, 1991; Kajava *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1996)(Gudermann *et al.*, 2005).

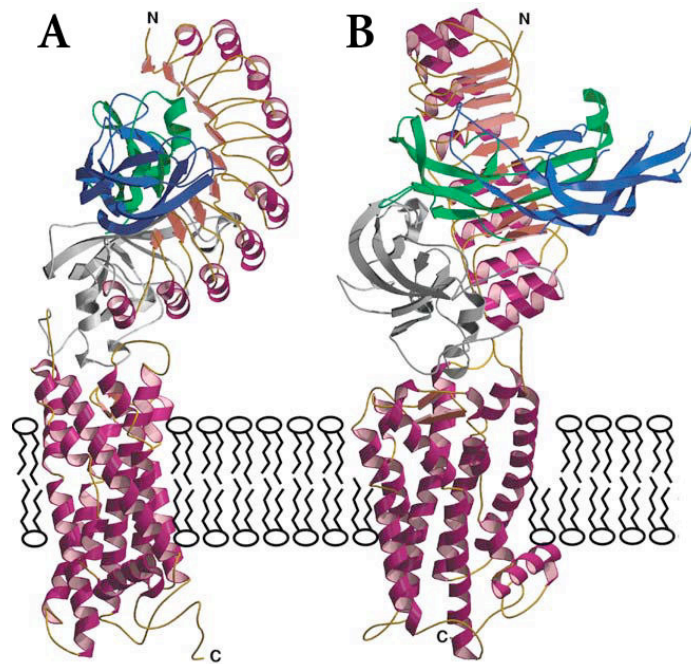


Abbildung 7: Computergeneriertes Strukturmodell des TSHR im Komplex mit TSH; mit neun LRR ( $\alpha$ -Helices: rot;  $\beta$ -Faltblätter: gelb), der CFR (grau) und den sieben transmembran-Domänen; A und B sind die selben Strukturen um 90° gedreht (Nunez Miguel *et al.*, 2004)

Die kristalline Struktur des TSHR ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Fan und Hendrickson haben jedoch 2005 den dem TSHR verwandten FSH-Rezeptor (FSHR) mit seinem Liganden teilweise kristallisieren können (Abbildung 8). Der TSHR wird wegen seiner engen Verwandtschaft wahrscheinlich eine ähnliche Struktur aufweisen. In diesem Modell stellt sich der extrazelluläre Teil des FSHR als fast linear heraus, wobei das FSH in annähernd rechtem Winkel zu den  $\alpha$ -Helices orientiert ist (Fan *et al.*, 2005).

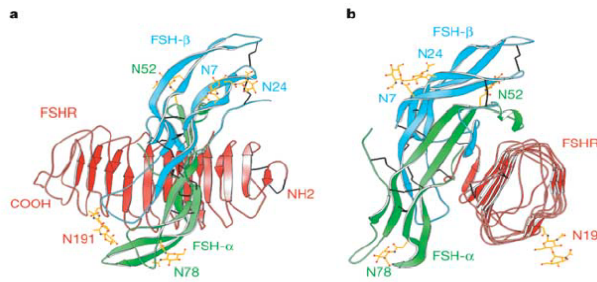


Abbildung 8: N-Terminus des FSH-Rezeptors (rot) mit FSH (blau & grün), Kohlenhydratstrukturen (gelb), Disulfidbrücken (schwarz); a und b sind die selben Strukturen um 90° gedreht (Fan & Hendrickson, 2005)

Zu der transmembranären Domäne zählen die intramembranären Teile sowie die extra-, bzw. intrazellulär liegenden Schleifen (I1-I3; E2-E4) des TSHR (Abbildung 6). Diese Domäne ist wichtig für die Signaltransduktion, also für die Übersetzung der extrazellulären Ligandenbindung in ein intrazelluläres Signal (Wonerow *et al.*, 2001). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die zweite und dritte intrazelluläre Schleife für die G-Protein-Bindung von Bedeutung ist und dass die dritte Schleife den jeweiligen GPCR für einzelne G-Proteine selektiver macht (Gether, 2000). Obwohl der TSHR mit allen G-Protein-Familien interagieren kann (Allgeier *et al.*, 1994; Laugwitz *et al.*, 1996), sind bisher hauptsächlich physiologische Funktionen der  $G_s$  und  $G_{q/11}$ -Aktivierung näher charakterisiert (Vassart & Dumont, 1992).

Für die Signaltransduktion sind das sechste transmembranöse Segment (TM6) sowie die dritte intrazelluläre Schleife (I3) von besonderer Bedeutung. Hier sind zahlreiche Mutationen bekannt, welche einen Ausfall des TSHR bedingen. (Duprez *et al.*, 1994; Kosugi *et al.*, 1994; Parma *et al.*, 1995; Porcellini *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1995; Spambalg *et al.*, 1996; Parma *et al.*, 1997). Dies hängt mit der Funktionsweise der G-Protein-Bindung mit seiner Bindungsstelle am TSHR zusammen. Wie bei anderen GPCRs gezeigt (Farrens *et al.*, 1996), hat beim TSHR die TSH-induzierte Konformationsänderung des TSHR zur Folge, dass ein Teil der TM6 sich relativ in Richtung Zellinneres bewegt. Auf diese Art und Weise wird ein Teil der TM6 des Rezeptors frei, welcher zuvor von der Zellmembran verdeckt wurde. Dieser Teil ist für die Bindung und Aktivierung eines G-Proteins wichtig (Abbildung 9) (Abell *et al.*, 1997; Neumann *et al.*, 2001). Man muss jedoch festhalten, dass die genauen molekularen Mechanismen, die für die G-Protein-Aktivierung am TSHR verantwortlich sind, noch nicht bekannt sind.

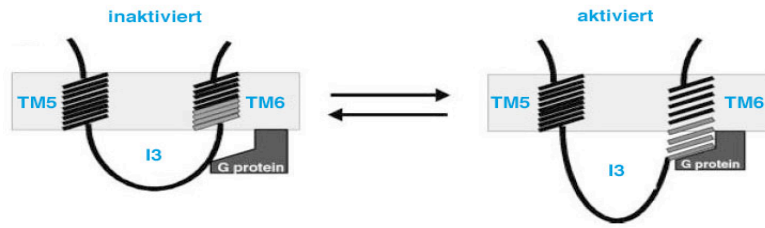


Abbildung 9: Ausschnitt des TSHR; TM6-Verschiebung nach Ligandenbindung; modifiziert nach Wonerow (Wonerow *et al.*, 2001)

#### 3.3.1. Mutationen des TSHR an Position Y601

Der erste humane TSHR-Klon (Nagayama *et al.*, 1989), welcher immer noch in zahlreichen Datenbanken als Referenz-cDNA präsent ist, wurde 1989 von einem an Morbus Basedow erkrankten Patienten isoliert. Dieser Klon weist eine Punktmutation in seiner Aminosäuresequenz auf, wodurch er nicht in der Lage ist, den in Kapitel 3.2.2.2 erwähnten  $G_{q/11}$ -Protein-gesteuerten Signalweg zu vollziehen (Arseven *et al.*, 2000). Gegenüber dem wildtypischen TSHR ist bei dem Klon am Ende der TM5 an der Position 601 ein Tyrosin durch einen Histidinrest ausgetauscht; die sog. Y601H-Mutation (Abbildung 10) (Biebermann *et al.*, 1998). Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Y601 (TM5) und A623 (TM6), die sich bei Stimulation des TSHR ausbildet, ist somit nicht mehr möglich. Auch Mutationen an A623 verursachen eine Inhibition des  $G_{q/11}$ -vermittelten Signaltransduktion des TSHR (Kosugi *et al.*, 1992). Bei einer japanischen Patientin mit kongenitaler primärer Hypothyreose konnte diese Punktmutation 1994 als stiller heterozygoter Polymorphismus nachgewiesen werden; ohne jedoch, dass die Hypothyreose auf diese Variante des TSHR zurückzuführen war. (Takeshita *et al.*, 1994; Biebermann *et al.*, 1998).

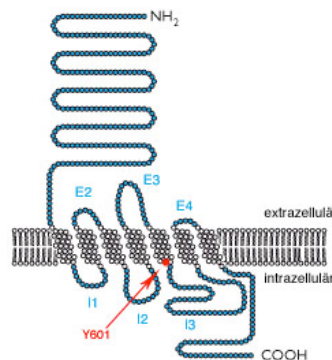


Abbildung 10: GPCR (TSHR); modifiziert nach Nussey (Nussey & Whitehead, 2001)

Die Mutante Y601H zeigt im Vergleich zum wildtypischen TSHR unter basalen Bedingungen sowie bei Stimulation ein unterschiedliches Verhalten: So vermittelt die Y601H-Mutante eine verringerte,  $G_S$ -abhängige basale cAMP-Synthese. Bei Stimulation zeigen beide TSHR-



Formen eine cAMP-Konzentrations-Akkumulation ( $G_s$ -Protein gesteuert). Nach TSH-Bindung weist die Y601H Mutante jedoch keinerlei Anstieg der  $IP_3$ -Konzentration auf ( $G_{q/11}$ -Proteingesteuert) (Biebermann *et al.*, 1998). Das  $G_{q/11}$ /PLC-System wird somit bei der Y601H-Mutante nicht aktiviert (Arseven *et al.*, 2000). Auch andere Insertionen an der Position Y601 (Y601A /D /F /K /P /S /W / $\Delta$ ), sowie an Y605 (Y605H / $\Delta$ ) zeigten ähnliche Folgen für das  $G_s$ /cAMP-System, gepaart mit Ausfällen des  $G_{q/11}$ /PLC-Systems (Biebermann *et al.*, 1998).

#### 3.4. Metallothionine

Novak et al. konnte 2004 in einem cDNA-Microarray zeigen, dass Schilddrüsenzellen mit dem Y601H mutierten TSHR gegenüber Zellen mit dem wildtypischen TSHR Unterschiede in ihrem Expressionsmuster aufweisen. Eine Gruppe, welche bei der Schilddrüse unterschiedlich stark exprimiert wird, sind die MT.

MT sind intrazelluläre, niedermolekulare, Cystein-reiche Proteine mit geringem Molekulargewicht (<7000 Da) und der Fähigkeit Metallionen zu komplexieren. Zum ersten Mal wurden sie 1957 von Margoshes und Vallee aus Pferde-Nierenzellen isoliert (Margoshes *et al.*, 1957). Sie kommen ubiquitär im menschlichen Organismus vor, wobei die Hauptaufgabe dieser Proteine nicht vollends geklärt ist. Aufgrund ihrer speziellen, cysteinreichen Aminosäurestruktur bilden sich sog. Thiolat-Cluster aus, welche die Eigenschaft besitzen Metallionen (hauptsächlich Zink (Zn), Kupfer (Cu) und Cadmium (Cd)) zu binden (Coyle *et al.*, 2002). MT kommen in unterschiedlichen Isoformen im Körper vor (MT1, MT2, MT3, MT4 (Vasak *et al.*, 2000)), wobei die Isoformen MT1 und MT2 am häufigsten exprimiert werden. Die MT-Gene sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert, insbesondere aber auf Chromosom 16. Dort befinden sich die Gene verschiedener Unterformen von MT1 (a, b, e, f, g, h und x) und MT2a. Die Expression der MT wird auf transkriptioneller Ebene reguliert. Die Promotoren der MT1 und MT2 Gene enthalten verschiedene metall- und glukokortikoidsensible Regionen (MRE und GRE) neben einer proximalen MTF-1 („metal-responsive transcription factor 1“) (Coyle *et al.*, 2002). Diese MTF-1 ist für die basale Expression der MT essentiell (Heuchel *et al.*, 1995) und reagiert auf Veränderungen der Zn-Konzentration im Cytoplasma. Induziert werden MT von verschiedenen Metallen (Cd, Cu, Zn, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi), Hormonen (Bsp.: Glukokortikoide, Catecholamine), Wachstumsfaktoren, Medikamenten,

### 3 Einleitung

Entzündungsmediatoren und verschiedenen Chemikalien (Andrews *et al.*, 1987; Bremner *et al.*, 1987; Imbra *et al.*, 1987; Palmiter, 1987; Nebes *et al.*, 1988; Coyle *et al.*, 2002). Auch verschiedene Umweltbedingungen, welche molekularen Stress für eine Zelle bedeuten, können MT induzieren: Nährstoffmangel, mikrobielle Stimuli, oxidativer Stress, Röntgenstrahlung, UV-Bestrahlung, etc. (Kagi, 1991).

Im Menschen bestehen die MT aus einer Polypeptidkette von 61 bis 68 Aminosäuren (Abbildung 11). Dabei besitzen sie 18-23 hoch konservierte Cysteinreste, aber weder aromatische Aminosäuren noch Histidin. Die Cysteinreste kommen lediglich in den Sequenztypen cys-cys, cys-x-cys und cys-x-y-cys im Protein vor. Ein MT ist aufgeteilt in eine stabile, C-terminale  $\alpha$ -Einheit und eine reaktivere, N-terminale  $\beta$ -Einheit. Die  $\alpha$ -Einheit kann vier Zinkionen, die  $\beta$ -Einheit drei Zinkionen aufnehmen (Abbildung 12) (Nielson *et al.*, 1985; Robbins *et al.*, 1991a; Robbins *et al.*, 1991b). Vier Schwefelatome fungieren im MT als Ligand für je ein zweiwertiges Metallion (vierflächiger Thiolat-Cluster, Thiolat-Tetraeder), während ein einwertiges Metallion ( $\text{Cu}^+$ ) von nur drei Schwefelatomen umgeben wird (Hamer, 1986; Robbins *et al.*, 1991a). Ein MT kann somit entweder 7 zweiwertige, oder 12 einwertige Metallionen enthalten (Chen *et al.*, 1996). Insgesamt können MT mit 18 verschiedenen Metallen agieren, jedoch nur Cu, Cd, Pb, Ag, Hg und Bi besitzen die Fähigkeit Zn am MT zu ersetzen (Nath *et al.*, 1988; Coyle *et al.*, 2002).

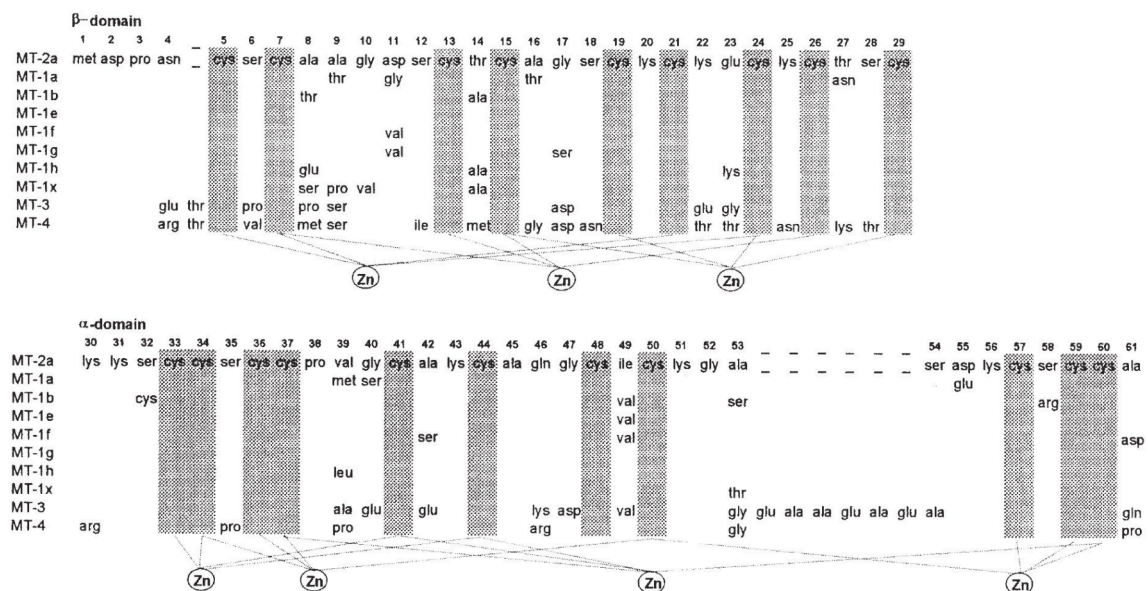


Abbildung 11: Aminosäuresequenz humaner Metallothioninen, mit der Zugehörigkeit der Zn-Atome zu ihrer jeweiligen Cysteinresten (grau hinterlegt); modifiziert nach Coyle (Coyle *et al.*, 2002)

Die höchste Konzentration von MT im Körper findet man in Leber, Nieren, Pankreas, im Darm und in schnell proliferierendem Gewebe. Dort haben MT u.a. die Aufgabe oxidativen

Schaden abzuwenden. Sie bilden hierfür Reduktionsäquivalente, indem je zwei Cysteinreste Disulfidbrücken ausbilden. Durch diese intramolekulare Bindung kann Zn nicht mehr gebunden werden und wird freigesetzt (Vasak, 2005). Außerdem dienen MT als Zn-/Fe-Reservoir der Zelle und wirken dadurch regulatorisch auf Zn-/Fe-Aufnahme, Speicherung und Freisetzung und somit regulatorisch auf Metalloenzyme und Transkriptionsfaktoren (Sato *et al.*, 1993; Cherian *et al.*, 2003). Durch die Fähigkeit, Schwermetalle wie Cd zu komplexieren, schützen MT die Zelle zusätzlich (Coyle *et al.*, 2002). Auch in der Apoptose scheinen MT eine Rolle zu spielen, indem sie die Proteine p53 und BAX supprimieren (Kondo *et al.*, 1997). In Neuronen spielt besonders die Isoform MT3 (Synonym: „neuronal growth inhibitory factor“, NGFI) eine Rolle (Pountney *et al.*, 1994). MT3 ist in Neuronen an Alzheimer erkrankten Patienten supprimiert (Uchida *et al.*, 1991).

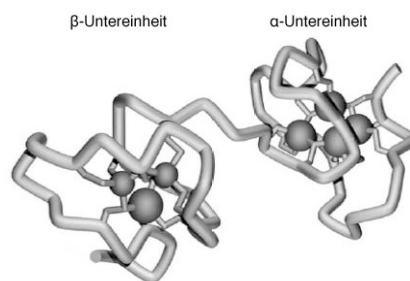


Abbildung 12: Dreidimensionale Darstellung von MT2 (Ratte) anhand Röntgenstrukturanalyse (Cd<sub>5</sub>, Zn<sub>2</sub>-MT2); Metalle sind durch graue Kugeln dargestellt, welche durch Cystein/Thiolat-Ligandenbindungen vom Protein komplexiert sind (modifiziert nach Vasák, 2005) (Vasak, 2005)

In der Schilddrüse könnte vor allem die Aufgabe der MT als Redoxsystem im Vordergrund stehen, da innerhalb der Zelle viele oxidative Äquivalente entstehen, wenn mit Hilfe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Jodid zu Jod reduziert wird.

### 3.5. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Abhängigkeit von Metallothioninen gegenüber dem G<sub>q/11</sub>-Protein vermittelten Signalweg des TSHR aufzuzeigen. Außerdem wurde ein besonderes Augenmerk darauf gelegt die Signalkaskade zu identifizieren, welche nach Stimulation des TSHR durch TSH zu einer MT-Expression führt.

Der TSHR ist Dreh- und Angelpunkt für eine Vielzahl von Stoffwechselwegen in Schilddrüsenepithelzellen. Es scheint, als sei er neben Zellproliferation, Hormonsynthese und Hormonausschüttung auch für die Expression von Metallothioninen von Bedeutung. Für viele

Aufgaben des TSHR sind die intrazellulären Signalwege bislang noch nicht ausreichend geklärt; so auch nicht für die Regulation der Expression von MT.

Vergleiche zwischen Zellen mit mutiertem TSHR, bei welchem der  $G_{q/11}$ -Protein vermittelte Signalweg ausgeschaltet ist, und dem wildtypischen TSHR wiesen darauf hin, dass genau dieser Signalweg für die Expression von MT1-Isoformen verantwortlich ist. Es stellte sich nun die Frage, ob man die Unterschiede in der Expression von MT1-Isoformen quantifizieren kann. Außerdem war unklar, ob die unterschiedliche Expression auf mRNA-Ebene auch Unterschiede in der MT1-Proteinmenge in Schilddrüsenepithelzellen nach sich ziehen würde. Schließlich sollte die TSHR-abhängige Regulation der MT1-Expression in primären Schilddrüsenzellen (SD-191) untersucht werden und durch die ergänzende Charakterisierung der MT1-Expression in diesem zusätzlichen Zellmodell die biologische Relevanz TSHR-gesteuerter Signalwege für die MT1-Expression beleuchtet werden

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Auflichtmikroskop	Zeiss, Jena
Binokular	Olympus, Hamburg
Brutschrank	HERAcell, Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Kamera, Axioacam MRC	Zeiss, Jena
Mikropipetierhilfen, Pipetman	10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, Gilson, Frankreich
Pasteurpipetten	Hirschmann, Heilbronn
Photometer	Helios γ, Unicam, Tecnomatix, USA
Real-Time-PCR-Gerät	LightCycler® 2.0, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Schüttler	Rocky 3D, Fröbel, Lindau
Spannungsquelle	Power-Pac 300, Biorad, USA
Szintillationszähler	LS6000 IC, Beckman, USA
Thermocycler	T3 Thermocycler, Whatman Biometra®, Göttingen
Zellkulturwerkbank	HERAsafe, Heraeus, Hanau
Zentrifugen	Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau Tischzentrifuge Biofuge pico, Heraeus, Hanau

## 4.2. Chemikalien und Reagenzien

Standardchemikalien wurden, falls nicht gesondert angegeben, von Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich GmbH (Deisenhofen) bezogen.

### 4.2.1. Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Agarose peqGOLD	Peq Lab, Erlangen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dNTPs (Desoxy-nukleotid-5'-triphosphat)	Fermentas, St. Leon-Rot
Eindeckmedium (Fluorescent Mounting Medium)	Dako Cytomation, Hamburg
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Filmentwickler (Dokumol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Formalin (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fötales Kälberserum	PAA, Pasching (Österreich)
Cadmiumchlorid (CdCl <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
MOPS (3-N-Morpholino-propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau S Lösung in 3 % TCA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth, Karlsruhe
TriFast GOLD	Peq Lab, Erlangen
Insulin	Calbiochem, Darmstadt
Somatostatin	Calbiochem, Darmstadt
Transferrin, Holo, Human Plasma	Calbiochem, Darmstadt

Gly-His-Lys Tripeptid	Calbiochem, Darmstadt
PBS (Zellkultur), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA, Pasching (Österreich)
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin / EDTA, Viralex	PAA, Pasching (Österreich)
Bisindolylmaleinimide II	Calbiochem, Darmstadt
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat	Calbiochem, Darmstadt

### 4.2.2. Enzyme, Größenstandards und Versuchskits

<i>Substanz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA Marker (100 bp und 1kbp)	Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR-Green PCR Kit, QuantiTect	Qiagen, Hilden

### 4.2.3. Primer

<i>Gen</i>	<i>Annealing-temperatur</i>	<i>Sequenz</i>
MT1X	58 °C	5'-AGGCACAGGAGCCAACAG-3' (forward) 5'-CTTCTCCTTGCCCTCGAAATG-3' (reverse)
MT1G	58 °C	5'-AACTCTAGTCTCGCCTCGGGTTG-3' (forward) 5'-ATTGTACTTGGGAGCAGGGCTGT-3' (reverse)
β-Aktin (Human/Murin)	61,4 °C	5'-GAGTACTTGCCTCAGGAGG-3' (forward) 5'-GGCTACAGCTTCACCACCAC-3' (reverse)

Die verwendeten Primer wurden von den Firmen Matabion, Planegg-Martinsried und MWG Biotech, Ebersberg hergestellt.

#### 4.2.4. Antikörper

Primärantikörper (Bezugsquelle: abcam, Cambridge (UK))

<i>Antigen</i>	<i>Donorspezies</i>	<i>Verdünnung</i>
Metallothionin (UC1MT)	Maus	1:1000 (Western Blot), 1:50 (ICC)
ERK2 (human)	Hase	1:1000 (Western Blot)
Phospho-STAT	Hase	1:1000 (Western Blot)
STAT	Hase	1:1000 (Western Blot)

Sekundärantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Donorspezies</i>	<i>Bezugsquelle</i>
Anti-Maus IgG (Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt)	Ziege	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-Maus IgG (Peroxidase gekoppelt)	Ziege	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-Hase IgG (Peroxidase gekoppelt)	Ziege	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

#### 4.3. Zellkultur

Kultiviert wurde die differenzierte, humane, follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC-133 sowie die Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie SD-191. Die FTC-133 Zelllinie exprimiert keinen funktionellen TSHR mehr. Als Modellsystem für die Untersuchung der Signaltransduktion des TSHR wurden die Zellen stabil mit zwei Varianten des TSHR transfiziert. In der einen Variante (FTC-133 wt) exprimieren sie den wildtypischen TSHR, und in der anderen (FTC-133 Y601H) einen mutierten TSHR. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Punktmutation, bei der am TSHR an Position 601 ein Tyrosin (Y) gegen ein Histidin (H) ausgetauscht worden ist. Diese Mutation führt dazu, dass der TSHR nicht mehr



an G<sub>Q/11</sub>-Proteine koppelt<sup>3</sup>. Die Zelllinie SD-191 hingegen exprimiert nativ einen funktionstüchtigen TSHR.

Die verschiedenen FTC-133 Varianten, sowie die SD-191 Zelllinie zeigen eine Kontaktinhibition, und wachsen in einem einschichtigen Zellverband adhärent an eine inerte Oberfläche mit einer Verdopplungszeit von ca. 30 Stunden (FTC-133), bzw. 40 Stunden (SD-191).

### **4.3.1. Kultivierung von Zellen**

Kultiviert wurden die Zellen in einem Brutschrank (HERAcell) bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Umgebungsluft (95 % Luft, 5 % CO<sub>2</sub>). Als Zellkulturgefäße wurden verschiedene Gefäßausführungen der Firma Sarstedt (Nürting) benutzt.

Als Zellkulturmedium diente Iscoves's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, mit 25 mM HEPES und L-Glutamine) der Firma PAA (Pasching, Österreich). Zugewetzt wurden: 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), Insulin (5 µg/ml), Transferrin (5 µg/ml), Somatostatin (10 ng/ml) und das Tripeptid Glycin-Histidin-Lysin (10 ng/ml). Dieses sog. „5-H Medium“ wurde bei 4 °C aufbewahrt und vor Verwendung auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

Um die Zellen in ein neues Kulturgefäß (75 cm<sup>2</sup>) zu überführen, wurden sie mit PBS (150mM NaCl, 1,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) gewaschen und anschließend mit 2 ml von Trypsin/EDTA (Viralex Trypsin/EDTA, PAA: 0,5 g/l Trypsin, 1,2 g/l EDTA in 1x PBS) behandelt. Je nach Zelldichte wurde der Zellrasen für 3-5 min im Brutschrank inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wurde das Trypsin mit 9 ml „5-H Medium“ inaktiviert. Die nun erhaltene Suspension konnte nun für die Teilung, bzw. das Aussäen der Zellen verwendet werden.

### **4.3.2. Kryokonservierung von Zellen**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in 10 % Dimethylsulfoxid und 90 % FCS bei -80 °C eingefroren. Hierzu wurden die Zellen als Suspension Polypropylen-Mikroschraubröhrchen (2 ml, Sarstedt) überführt und in einem Isopropanoltank langsam auf -80 °C abgekühlt.

---

<sup>3</sup> Im nachfolgenden Text wird für die FTC-133 Zelllinie, welche den wildtypischen TSHR exprimiert, das Kürzel „FTC-133 wt“ benutzt sowie für die FTC-133 Zellen, welche den Y601H mutierten TSHR exprimieren, das Kürzel: „FTC-133 Y601H“.

### **4.4. RNA Isolierung**

Die RNA wurde mittels einer modifizierten Single-Step-Methode nach Chomczynski et al. als Gesamt-RNA isoliert (Chomczynski *et al.*, 1987). Das benutzte Fertiggemisch (peqGOLD TriFast™) besteht unter anderem aus GTC (Guanidinisothiocyanat), einem chaotropen Salz, Phenol, Wasser, Natriumacetat und einem Puffer.

#### **4.4.1. Durchführung**

Zur Isolierung wurden FTC-133 Zellen in Zellkulturschalen (100x20 mm; Sarstedt) kultiviert. Pro Kulturschale wurden 5 ml TriFast™ auf die Zellen (Zellzahl ca.  $1 \times 10^7$ ) gegeben. Das Lysat wurde in sterile Reaktionsgefäße (2 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die weiteren Schritte auf Eis fortgesetzt, um einen möglichen Abbau durch RNAsen zu verlangsamen. Zu 5 Teilen TriFast™ wurde ein Teil Chloroform zugesetzt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurde das Lysat für 10 min zentrifugiert (20000 x g, 4 °C). Dabei bildeten sich zwei Phasen: in der wässrigen Oberphase war die RNA des Lysates gelöst, die phenolische Unterphase enthielt denaturierte Proteine. Die genomische DNA bildete ein wolkiges Sediment an der Grenze zur Unterphase (Interphase).

Nach der Entnahme der wässrigen Oberphase wurde die RNA durch Zugabe von einem gleichen Volumen Isopropanol ausgefällt. Daraufhin wurden die Proben für 30 min zentrifugiert (20000 x g, 4 °C). Die sedimentierte RNA (sog. Pellet) wurde mit Ethanol (70 Vol. %) gewaschen und ein weiteres Mal zentrifugiert (20000 x g, 4 °C, 10 min). Das Ethanol wurde vorsichtig abgeschüttet und das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Zum Schluss wurde das RNA-Pellet mit RNAsen freiem Wasser (100 µl) resuspendiert.

Die Konzentration an RNA und Proteinen der Proben wurde mit photometrischer Bestimmung der Lichtabsorption untersucht. Der Quotient der Absorption der Lösung bei 260 nm (RNA) und der Absorption der Lösung bei 280 nm (Proteine) sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen, um eine relevante Verunreinigung mit Proteinen auszuschließen. Zusätzlich überprüft man mit Hilfe einer Agarose-Gel-Elektrophorese die Integrität der isolierten RNA.

#### **4.4.2. Die Agarose-Gel-Elektrophorese für RNA**

In der Agarose-Gel-Elektrophorese beurteilt man zwei Banden, welche durch ribosomale RNA (18 S und 28 S RNA, Teile der kleinen und großen Untereinheit der Ribosome) hervorgerufen wird.

Hierfür wurde ein Agarose-Gel verwendet, welches aus 1 % (w/v) Agarose in RNase freiem Wasser besteht. Außerdem enthielt das Gel: 0,4 M 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure-(MOPS)-Laufpuffer (pH: 7,0; 0,1 M Natriumacetat, 0,01 M EDTA in autoklaviertem DEPC-Wasser<sup>4</sup>), Ethidiumbromid (0,25 µg/ml) und 1 % (v/v) Formaldehyd.

In die Taschen der Gele wurde das gleiche Probenvolumen mit jeweils der gleichen Menge an RNA (1 µg) gegeben. Der Probenpuffer enthielt: MOPS-Laufpuffer (Volumen je nach RNA-Konzentration in den Ausgangsproben), 30 % (v/v) Formaldehyd, 10 % (v/v) Ladepuffer (Loading Dye Solution; Fermentas, St. Leon-Rot) und 50 % (v/v) Formamid.

Als Laufmedium wurde ein MOPS-Laufpuffer (0,4 M, in autoklaviertem DEPC-Wasser angesetzt) gewählt. Die Elektrophorese wurde 90 Minuten bei 80 V durchgeführt.

### 4.5. RT-PCR

Die so gewonnene RNA wurde daraufhin zur Synthese von cDNA verwendet. Hierfür wurde das „First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet, welches das aus Retroviren<sup>5</sup> stammende Enzym reverse Transkriptase verwendet. Es handelte sich bei dieser reversen Transkriptase (RevertAid™ H Minus M-MuLV RT; 200 U/µl; Fermentas) um ein Enzym aus dem Moloney murine leukemia Virus.

#### 4.5.1. Synthese der cDNA

Hierfür wurden 2,5 µg aus den Zellen gewonnene RNA mit 0,5 µl Random-Hexamerprimer (Fermentas), 5 µl dNTP-Gemisch (dNTP-Mix; Fermentas) und Wasser (Gesamtvolumen: 12 µl) gemischt und auf 65°C für 5 Minuten erhitzt. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 2 µl des Puffers (Buffer für M-MuLV RT; Fermentas, St. Leon-Rot) zu den Proben hinzugegeben und diese für 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Im letzten Schritt wurde 1 µl der M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas) zu dem Ansatz hinzugefügt. Die Proben wurden nun auf 37 °C für 50 Minuten erwärmt (Synthese der cDNA). Daraufhin wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C (15 min) gestoppt.

---

<sup>4</sup> DEPC-Wasser: Diethylpyrocarbonat-Wasser; dient zur Inaktivierung von RNAsen im Wasser

<sup>5</sup> Einzel(+)-Strang-RNA-Virus, (ss(+))RNA), dessen Erbinformation als RNA vorliegt, aber als DNA in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird.

#### 4.5.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Expressionsstärke von Metallothioninen wurde mit Hilfe der RTD-PCR (Kap. 4.5.3) quantifiziert. Zur näheren Beschreibung dieser Methode sei im Folgenden eine Darstellung des Prinzips der PCR erklärt:

Die Ausgangsprobe DNA wird mit einer Taq-Polymerase, einem Überschuss an spezifischen Oligonucleotidprimer, Nucleotiden (dNTPs) und Puffer versetzt und in die PCR-Maschine gestellt. Die Taq-Polymerase ist eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, welche aus thermophilen Bakterien isoliert worden ist (*Thermus aquaticus*). Sie besitzt ihr Aktivitätsmaximum bei 72°C. Der eigentliche Mechanismus der PCR basiert auf die zyklische Wiederholung von drei Schritten: Denaturierung, Anlagerung von Primern (Annealing) und Elongation.

Während der Denaturierungsphase wird der DNA-Doppelstrang aufgrund der Aufspaltung der Wasserstoffbrücken durch hohe Temperatur zwischen den gegenüberliegenden Basenpaaren aufgetrennt, so dass sich im nächsten Schritt, der Annealingphase, die Primer an komplementäre Sequenzen anlagern können. Im letzten Schritt kommt es bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, zur Elongation d.h. zur Auffüllung der Stränge mit Nukleotiden. In jedem Zyklus kommt es so zu einer Verdopplung der eingesetzten DNA-Menge. Diese exponentielle Zunahme lässt sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$N = N_0 \cdot (1 + E)^n$$

$N_0$	Anfangsmenge der DNA
$N$	Menge an Amplifikat nach n Zyklen
$n$	Anzahl der Zyklen
$E$	Effizienz der PCR

#### 4.5.3. Quantitative PCR (Real-Time Detection PCR)

Um eine Aussage über die Anfangsmenge ( $N_0$ ) an DNA in einer Probe machen zu können, kam die Real-Time detection PCR (RTD-PCR) zur Anwendung. Bei der DNA handelte es sich um cDNA, welche aus RNA von FTC-133 Zellen gewonnen wurde. Die RTD-PCR wurde am LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) durchgeführt und die Daten mit der LightCycler® Software Version 4.05 analysiert. Als Reaktionsgefäße wurden LightCycler®-Glaskapillaren (20 µl; Roche, Penzberg) verwendet.

In jede Glaskapillare wurden 1 µl cDNA-Probe, 1 µl Primer, 5 µl SYBR®-Green (QuantiTect™ SYBR®-Green PCR Kit; Qiagen, Hilden) und 3 µl Wasser pipettiert. Die

Proben wurden verschlossen und 10 sek. bei 400 x g zentrifugiert. Daraufhin wurden die Proben in die LightCycler®-Maschine gestellt und folgendes PCR Programm gestartet:

Tabelle 1: RTD-PCR-Protokoll für MT-Primer

<i>Zyklus (Anzahl)</i>	<i>Schritt</i>	<i>Prozess</i>	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Zeit (min)</i>
Zyklus 1 (1x)	1	Aktivierung der Polymerase	95	00:15
Zyklus 2 (45x)	1	Denaturierung	95	00:10
	2	Primer-Anlagerung (Annealing)	57	00:20
	3	Elongation	72	00:20
	4	Datengewinnung / Echtzeitanalyse	80	00:10
Zyklus 3 (1x)	1	Abkühlung	65	00:15
	2	langsame Denaturierung (Melting) und kontinuierliche Datengewinnung	95	(mit der Geschwindigkeit: 0,1 °C/s)
Zyklus 4 (1x)	1	Kühlung	42	00:30

### 4.5.4. Funktionsweise

Die quantitative PCR beruht auf der typischen Kinetik einer Polymerase-Kettenreaktion. So kann semiquantitativ auf die Anfangskonzentrationen einer DNA-Probe (Template-DNA) geschlossen werden. Bei den anfänglichen PCR-Zyklen findet ein exponentielles Wachstum der DNA-Fragmente statt, während später diese in ein lineares Wachstum übergehen. Bei fortlaufender Reaktion kommt es zu keinem weiteren Konzentrationsanstieg mehr (Plateau). Dies hat mehrer Gründe: Konkurrenzreaktion zwischen Strang-Reannealing und Primer-Annealing bei höheren Zyklenzahlen; Inaktivierung der Polymerase durch thermische Belastung; Akkumulation von Pyrophosphat, das sich während der Reaktionen bildet (Köhler, 1995; Mülhardt, 2003). Für eine Quantifizierung ist es entscheidend, den Moment festzuhalten, in dem ein linearer Zusammenhang zwischen Ampifikatbildung und Zyklenzahl erstmals besteht („Crossong Point“; CP). Da man bei der RTD-PCR den gesamten Amplifikationsvorgang online verfolgen kann, ist man in der Lage den Übergang in den linearen Bereich genau zu verfolgen und so den CP zu bestimmen (Abbildung 13).

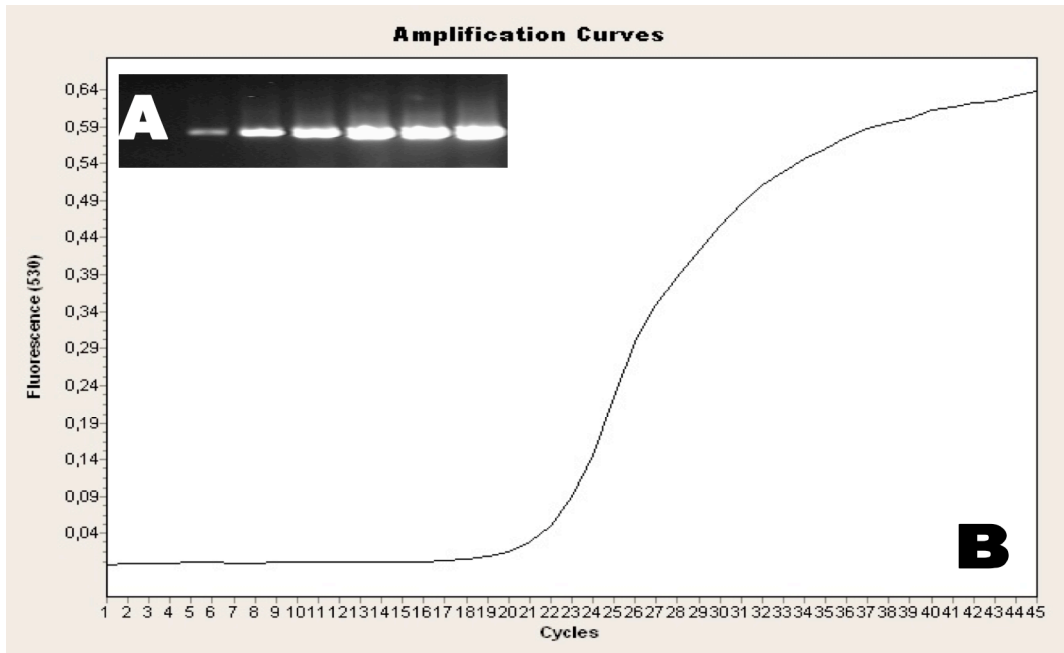


Abbildung 13: Vergleich densitometrische Auswertung (A) und Auswertung von RTD-PCR (B)

Für die RTD-PCR wurden verschiedene Fluorophore entwickelt, um direkt oder indirekt die mit der DNA-Amplifikation verbundene Fluoreszenzänderung zu bestimmen (Bustin, 2000). In der hier vorliegenden Arbeit wird die DNA-Amplifikation durch den Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green untersucht. Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der nach der unspezifischen Interkalation in die DNA die Eigenschaft gewinnt, nach Stimulation mit Licht einer bestimmten Wellenlänge wiederum Licht zu emittieren. So führt SYBR-Green bei fortschreitender Zyklenzahl zu einem Anstieg der Fluoreszenzfähigkeit der Probe (Abbildung 14).

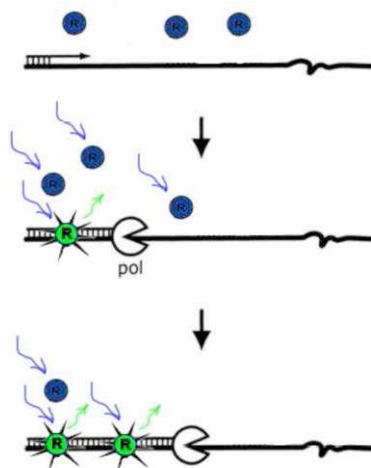


Abbildung 14: Funktionsweise von SYBR-Green (pol, Polymerase; R, SYBR®-Green)

Nach der eigentlichen PCR folgt das sog. Melting. Hier wird das Amplifikat schrittweise erhitzt während man kontinuierlich die Fluoreszenz der Probe misst. So kann man die Temperatur bestimmen, bei der der produzierte DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen wird. An diesem Zeitpunkt nimmt die Fluoreszenz der Probe ab (Abbildung 15), weil das SYBR®-Green seine Position innerhalb des Doppelstranges verlassen muss. Diese Temperatur ist für die Größe des DNA-Produktes spezifisch. So kann man also Rückschlüsse auf Art und Anzahl verschiedener DNA-Fragmente in der Probe schließen.

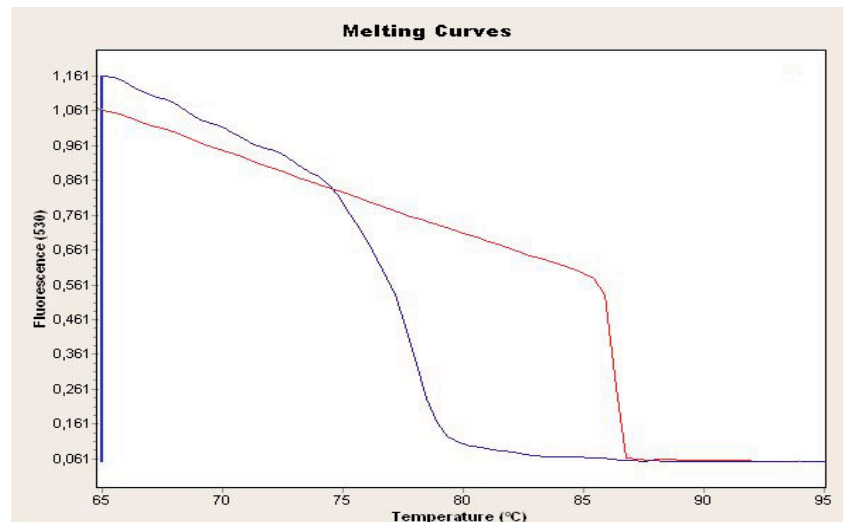


Abbildung 15: Schmelz-Kurven zweier Proben mit sich unterscheidenden DNA-Produkten

### 4.5.4.1. Berechnungen

Um nun das Template-DNA-Verhältnis verschiedener Ansätze zu berechnen benötigt man zwei Dinge:

- Parallel zu jeder Probe muss ein Ansatz mit derselben DNA-Probe, aber mit einem Kontroll-Primer untersucht werden. Durch diesen Primer sollte ein Template-DNA-Abschnitt vervielfältigt werden, der in allen Proben in gleicher Konzentration vorkommt. In diesem Versuch wurde  $\beta$ -Aktin als Kontrolle gewählt. Man kann davon ausgehen, dass das Gen von diesem Protein in allen FTC-133 Zellen unabhängig von der Stimulation in gleicher Größenordnung exprimiert wird.
- Man benötigt für die weiteren Berechnungen von jeder Probe den sog. „Crossing Point“ (CP), der durch das Computerprogramm (LightCycler® Software 4.05) bestimmt wird. Der „Crossing Point“ bezeichnet den Punkt in der Fluoreszenz-Kurve (Abbildung 15), bei dem der exponentielle Anstieg an Fluoreszenz linear wird. Der CP ist abhängig von der Template-DNA-Konzentration.

Nun kann man das Konzentrationsverhältnis (ConcentrationRatio) von Template-DNA zwischen den Proben mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$\text{ConcentrationRatio}(CR) = \left[ \frac{2^{CP(\text{Aktin})}}{2^{CP(\text{Metallothionin})}} \right]$$

Um Fehler zu vermeiden wurde jedes Konzentrationsverhältnis auf einen „Leer-Wert“ bezogen (jeweils für Aktin, und Metallothionin). Beim „Leer-Wert“ wurde Wasser anstelle von DNA zu den Proben pipettiert:

$$\text{NormalizedRatio}(NR) = \frac{CR(\text{Probe})}{CR(\text{LeerWert})}$$

Die „Normalized Ratio“ (NR) ist nun die Maßzahl, mit der man die verschiedenen Proben miteinander vergleichen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden von den Einzelergebnissen der NR gestutzte Mittelwerte und die Standardabweichungen gebildet.

### 4.6. Western Blot

Um einzelne Proteine (z.B. MT, pSTAT) in Zellen nachzuweisen, wurden Zelllysate durch eine diskontinuierliche, denaturierende, SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel-Electrophoresis) nach Laemmli (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Einzelne Proteine wurden daraufhin durch Immunoblotting detektiert.

#### 4.6.1. SDS Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zu Grunde des SDS-PAGE lagen verschieden stimulierte Zellproben (FTC-133, SD 191). Sie wurden nach dem Waschen (mit PBS) mit je 200 µl Probenpuffer nach Laemmli (125 mM Tris-HCl; 20 % Glycerol; 4 % SDS; 2 % 2-Mercaptoethanol; 10 µg/ml Bromphenolblau; pH 6,8) versetzt. Nachdem die Proben in Reaktionsgefäße (2ml, Eppendorf) überführt worden waren, wurden sie für 5 min auf 95 °C erhitzt.

Das stark anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt zweierlei: auf der einen Seite verlieren die nativen Proteine ihr nicht kovalenten Wechselwirkungen, auf der anderen Seite werden die Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht negativ geladen. Das niedermolekulare Thiol 2-Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten im Protein, und die hohe Temperatur von 95 °C wirkt zusätzlich denaturierend. Demzufolge verlieren die für ein Protein charakteristischen Ladungen und Tertiärstrukturen



bei der Gelelektrophorese ihren Einfluss auf die Auftrennung. So werden die Proteine ausschließlich entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

Das zweigeteilte Gel (Sammelgel / Trenngel) mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (Acrylamid / Bisacrylamid, 37,5 / 1) und diskontinuierlichem Puffersystem geht ebenfalls auf Laemmli (Laemmli, 1970) zurück. Diese Zweiteilung hat den Vorteil, dass sich die Proteine an der Grenzfläche der beiden Gele sammeln und so die Auflösung des SDS-Page erhöht wird. Das poröse Sammelgel (4 % Acrylamid) besaß einen pH-Wert von 6,8 und eine Tris/HCl -Konzentration von 0,5 M. Das Trenngel hingegen besaß einen pH-Wert von 8,8 und eine Tris/HCl-Konzentration von 1,5 M. Je nach Molekülgröße des gesuchten Proteins wurde eine 9 %-ige oder 18 %-ige (ab Molekülgrößen kleiner als 50 kDa) Acrylamidkonzentration verwendet. Die Polymerisation der Acrylamid-Gele wurde durch Zugabe von Amoniompersulfat (30 µg/ml) und Tetramethylethyldiamin (0,45 % (v/v)) gestartet. Es wurden pro Spur 20 µl Zelllysat gegeben, was eine Proteinmenge von etwa 30 µg entspricht. Außerdem wurde ein Größenmarker (Prestained Protein Marker; BioLabs, Frankfurt am Main) aufgetragen. Das Gel wurde bei 25 mA für 1 bis 3 Stunden (je nach Gelgröße und Acrylamidkonzentration) elektrophoriert.

### 4.6.2. Immunoblotting

Durch das Immunoblotting wird im Western Blot das hohe Auflösungsvermögen der SDS-PAGE mit der hohen Selektivität von Antigen/Antikörperkomplexen kombiniert. Die aufgetrennten Proteine werden auf eine Trägermembran (Protran®, Nitrocellulose Transfer Membrane; Schleicher & Schuell, Dassel) übertragen, und dort wird mit Hilfe von Antikörpern selektiv Protein nachgewiesen (Towbin et al., 1979)

Für das Übertragen der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde das Trenngel mit den aufgetrennten Proteinen zusammen mit der Membran in eine Kammer gespannt, so dass Membran und Gel in direktem Kontakt zu einander stehen. Danach wurden die Kammern in ein Gefäß mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,02 % SDS) gestellt und ein elektrisches Feld angelegt (40 V für 12h oder 240 V für 2 h). So konnten alle Proteine auf die Membran wandern, wo sie für die Antikörperbindung besser zugänglich sind. Nach Beenden des Blotting wurde mit der Nitrocellulosemembran ein Folge von Inkubations- und Waschvorgängen auf einem Schüttler durchgeführt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Immunoblotting, Inkubations- und Waschanleitung; RT = Raumtemperatur (ca. 22 °C)

<i>Schritt</i>	<i>Substanz</i>	<i>Zeit (hh:mm)</i>
1	Blocken mit 20 ml Roti-Block	01:00
2	Waschen mit 10ml PBS	Wenige Sek.
5	Inkubation des 1. Antikörpers (20 ml, in 5 % PBS/Milchpulverlösung)	01:00 (RT) 12:00 (4 °C)
6-8	Waschen mit jew. 20 ml PBS	Je 00:10
9	Inkubation des 2. Antikörpers (Peroxidase gekoppelt), der den Fc-Teil des ersten Antikörper als Antigen hat (20 ml, in 5 % PBS/Milchpulverlösung)	01:00
10-11	Waschen in jew. 20 ml PBS-T	Je 00:10
12	Waschen in 20 ml PBS	00:10

Um den Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper nachzuweisen wurde eine Chemolumineszenz-Nachweismethode angewendet. In einer Filmkassette (Hypercassette, Amersham Bioscience, Freiburg) wurden die Nitrocellulosemembran mit 2 ml ECL-Reagenz (1:1 Gemisch von ECL Plus Western Blotting Detection Reagent 1&2; Amersham) inkubiert. Eingebettet in Frischhaltefolie wurde in der Dunkelkammer ein Film (X-OMAT UV Film, 5-100 NIF; Kodak, Stuttgart) auf die Membran gelegt und über Nacht belichtet. Abschließend wurde der Film mit Dokumol (Tetenal, Nordersted) entwickelt und mit einer Fixierer-Lösung (1,26 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$  und 0,11 M  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) fixiert. Der gewaschene und getrocknete Film stand so am Ende der Befundinterpretation zur Verfügung.

### 4.7. Mikroskopie

Proteine von FTC-133 Zellen, welche von Interesse waren, wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Hierfür wurden die Proteine mit Antikörpern markiert und indirekt im Mikroskop betrachtet.

Dabei kamen sowohl ein Fluoreszenzmikroskop zum Einsatz (Axiovert 200M; Zeiss, Jena), als auch ein konfokale Laser-Scan-Mikroskop (LSM 510 Meta mit AxioCam HR; Zeiss, Jena).

### **4.7.1. Probenvorbereitung und Immuncytochemie (ICC)**

Die FTC-133 Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und in jedes Loch wurde ein steriles, rundes Deckgläschen (Durchmesser: 25 mm; Menzel-Gläser, Braunschweig) gelegt. So wurde den Zellen die Möglichkeit gegeben, auf den Deckgläschen adhärent zu wachsen. Kultiviert wurden die Zellen in „5-H“ Medium und 18 Stunden vor Stimulation wurden diese in serumfreiem, reinem IMD-Medium (PAA, Pasching) zur Proliferationspause gebracht.

Nach der Stimulation der Zellen mit TSH,  $\text{CdCl}_2$ , etc. wurden die Deckgläschen mit den FTC-133 Zellen mit PBS gewaschen und mit auf 37 °C vorgewärmten Paraformaldehyd (4% in PBS) 15 Minuten lang fixiert. Nach weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit Hilfe von Triton X-100 (0,1 % in PBS) wieder permeabilisiert und in 10 %-igen Goat-Serum (in PBS; Goat Serum Donor Herd; Sigma, Deisenhofen) eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, d.h. für die unspezifischen Bindungen von Antikörpern resistenter gemacht. Daraufhin wurde der Erstantikörper (gelöst in 5 %-igen Goat-Serum) auf die Zellen gegeben und 3 Stunden bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Anschließend wurden die Proben mit PBS gewaschen und der Zweitantikörper (mit Fluoresceinisothiocyanat (FTC) gekoppelter Anti-Mouse Antikörper in 5 %-igen Goat Serum) im Dunklen eine Stunde lang mit den Proben inkubiert.

Nachdem die Proben schließlich ausreichend gewaschen waren, wurden diese mit Hilfe von Mountig-Medium (DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium; Dako, Hamburg) auf Objektträgern (Roth, Karlsruhe) fixiert. So standen nun die Proben der mikroskopischen Betrachtung zur Verfügung.

### **4.7.2. Fluoreszenzmikroskopie**

Die fixierten Proben wurden nun im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M; Zeiss, Jena) betrachtet. Hierbei wurden die Zellen sowohl im Hellfeld als auch unter Beleuchtung mit Licht der Wellenlänge 490 nm beurteilt. Bei dieser Beleuchtung des Fluoresceinisothiocyanat (FITC) werden Elektroden (meist von konjugierten Doppelbindungen) auf ein höheres Energieniveau angehoben. Unter Emission von Licht einer stoffspezifischen Wellenlänge (längerwellig als die Anregungswellenlänge) gelangen die Elektroden auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück.

#### 4.7.3. Konfokale Laserscanmikroskopie (CLSM)

Die Untersuchung von vergleichsweise dicken Präparaten wie Zellen gestaltet sich mit der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie als relativ schwierig, da trotz korrektem Fokussieren oft noch Licht von Fluorophoren, die außerhalb des Fokus liegen, in den Detektor (Kamera) gelangen. Im Gegensatz zur herkömmlichen Mikroskopie erlaubt die CLSM die Betrachtung einzelner Schnitte durch die Präparate und bietet somit eine höhere Ortsauflösung (Matsumoto, 1993).

Bei der CLSM werden Laser als Lichtquelle verwendet, deren Licht durch eine Blende (Pinhole) tritt, so dass ein definierter Lichtpunkt einen definierten Ausschnitt aus dem Präparat bestrahlt (Abbildung 16). Dadurch wird verhindert, dass Licht, welches außerhalb der Fokusebene liegt, auf den Detektor trifft. Durch Fokussierung in der z-Ebene können Zellen mit einer Schichtdicke von  $0,1\ \mu\text{m}$  pro optischen Schnitt analysiert werden.

Die Analyse wurde mit dem LSM 510 Meta (Zeiss, Jena) durchgeführt, wobei die Präparate mit einem Argon Laser (spezifische Anregungswellenlänge für FITC:  $488\ \text{nm}$ , 10 %) angeregt wurden (Pinhole:  $101\ \mu\text{m}$ ; Pixel-Time:  $3,2\ \mu\text{s}$ ).

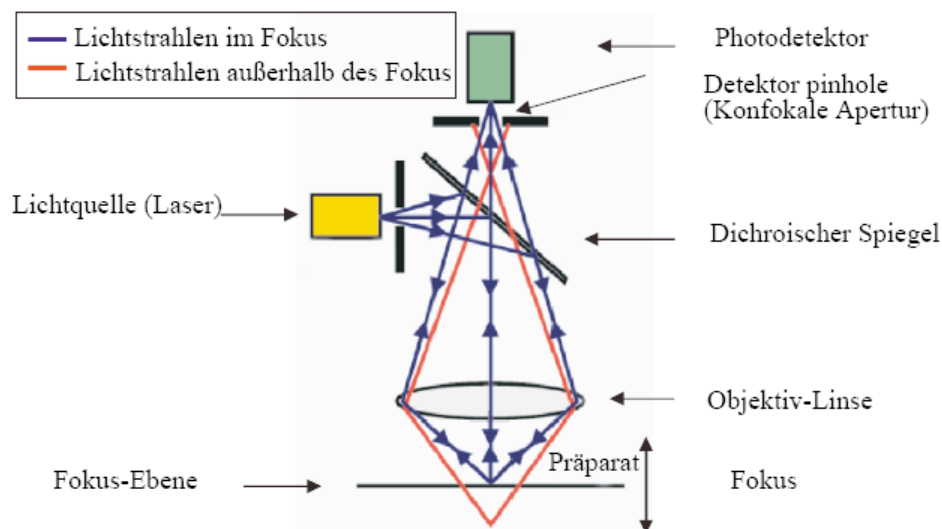


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Strahlenganges im CLSM (modifiziert nach einer Abbildung zugänglich auf der Internetpräsenz der Firma Zeiss®)

## 5. Ergebnisse

Um  $G_{q/11}$  abhängige Signalwege des TSHR in Schilddrüsenkarzinomzellen zu identifizieren, bedienten sich Novak et al. der Zelllinie FTC-133 Y601H. Diese Zelllinie exprimiert einen mutierten TSHR, bei welchem genau dieser Signalweg des TSHR unterbrochen ist.

### 5.1. Regulation der MT-1-Transkription in FTC-133-Zellen

In einem cDNA-Microarray konnten Novak et al. (2004) aufzeigen, dass sich nach TSH Stimulation FTC-133 wt Zellen im Expressionsmuster von FTC-133 Y601H Zellen unterscheiden. Von 2000 untersuchten Genen wurden 169 detektiert, welche unterschiedlich stark exprimiert wurden. Von diesen waren 81 in FTC-133 Y601H herunterreguliert und repräsentieren somit potentiell  $G_{q/11}$  abhängige Zielgene (Tabelle 3).

Tabelle 3 Liste der differentiell regulierten Gene, sortiert nach funktionellen Gruppen: Der aus dem cDNA-Microarray berechnete differentieller Faktor gibt an, um welchen Wert die Gene in den Zellen mit y601h mutierten TSHR im Vergleich zu den Zellen mit wildtypischen TSHR hochreguliert, bzw. bei negativen Vorzeichen, runterreguliert sind.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Differenzieller Faktor</i>
Metallothionine:	
MT 1G	-4,33
MT 1X	-4,20
MT 1B functional	-3,02
MT 1H	-2,99
PKC-abhängige Signalwege:	
Protein kinase C, $\gamma$	-3,36
Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	-2,11

Unter den herunterregulierten Genen, fielen besonders die MT durch ihre stark unterschiedliche Regulation auf. Ziel dieser Arbeit war es nun, die Regulation der MT im Zusammenhang mit der Aktivierung des  $G_{q/11}$ -Proteins am TSHR zu verifizieren und den zugrunde liegenden Mechanismus aufzuklären.

#### 5.1.1. MT1x und MT1g nach TSH Stimulation

Um diese Expressionsunterschiede zwischen den beiden vorliegenden Zelllinien (FTC-133 wt und FTC-133 Y601H) genauer zu beschreiben, wurden die Expressionsmuster von MT1x und MT1g anhand von cDNA-Proben mittels Real-Time detection PCR (RTD-PCR) quantifiziert.

Diese Varianten der MT wiesen im cDNA-Microarray die höchsten Expressionsunterschiede auf (Tabelle 3).

Die verschiedenen Zellproben wurden mit 25 mU/ml, 50 mU/ml oder 100 mU/ml TSH für je drei, sechs oder zwölf Stunden stimuliert. Das Ergebnis der Messungen wird als relative Expression von MT1x (bzw. MT1g) gegenüber einer unstimulierten Probe angegeben (Normalized Ratio, NR). Außerdem beziehen sich die Berechnungen jeweils auf humanes  $\beta$ -Aktin als internen Standard (siehe Kap. 4.5.4.1).

### *MT1x*

Schon bei einer TSH-Konzentration von 25 mU/ml reagierten die FTC-133 wt Zellen mit einer signifikanten Steigerung der Expression von MT1x. So wurde das MT1x-Gen nach 3 Stunden um den Faktor 2,7 hochreguliert; nach 6 Stunden zeigte sich ein Anstieg um den Faktor 4,6 und nach 12 Stunden um den Faktor 5. Bei den FTC-133 Y601H Proben hingegen konnte keine Stimulation der MT1x Expression über dieselbe Zeit gezeigt werden. Nach einer Repression auf NR=0,5 nach 3 Stunden blieb die MT1x Expressionsstärke ungefähr auf dem Niveau der unstimulierten Probe (Abbildung 17).

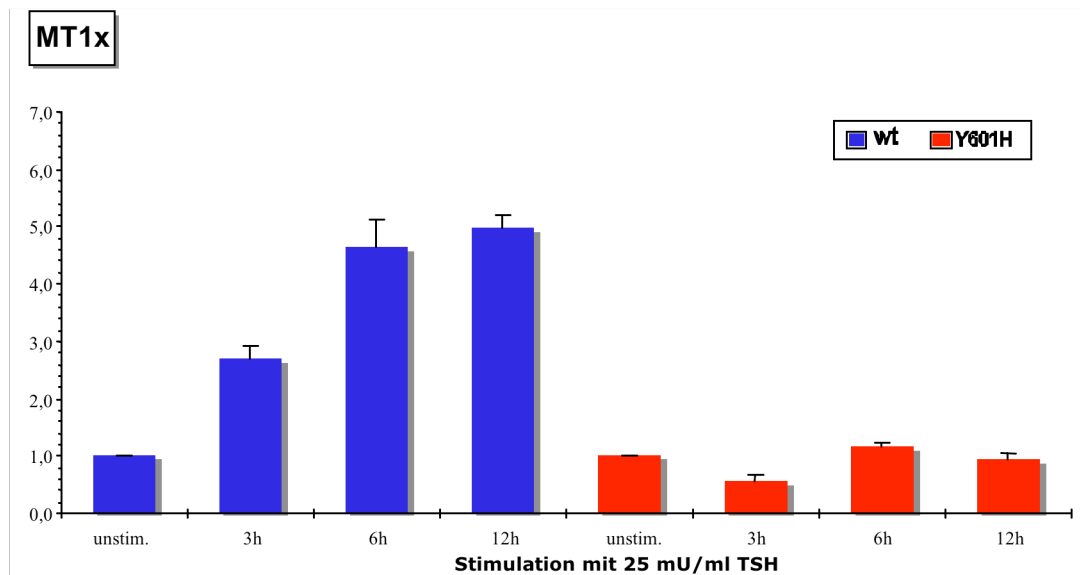


Abbildung 17: Ergebnisse der RTD-PCR; gestutzte Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression von MT1x in Bezug zur unstimulierten Standardprobe (NR) in FTC-133 Zellen (n = 7) mit jeweils  $\beta$ -Aktin als internem Standard

## 5 Ergebnisse

Ein ähnliches Bild zeigten die FTC-133 wt Zellen, nachdem sie mit TSH von einer Konzentration von 50 mU/ml stimuliert worden waren. Nach 3h stieg die MT1x Expression in FTC-133 wt Zellen um den Faktor 2, nach 6 Stunden um den Faktor 2,7 und nach 12 Stunden um den Faktor 5,3. Auch hier fand sich keine Steigerung der Expression vom MT1x-Gen bei FTC-133 Y601H. Die NR befand sich nach 3, 6 und 12 Stunden weiterhin bei ungefähr eins (Abbildung 18).

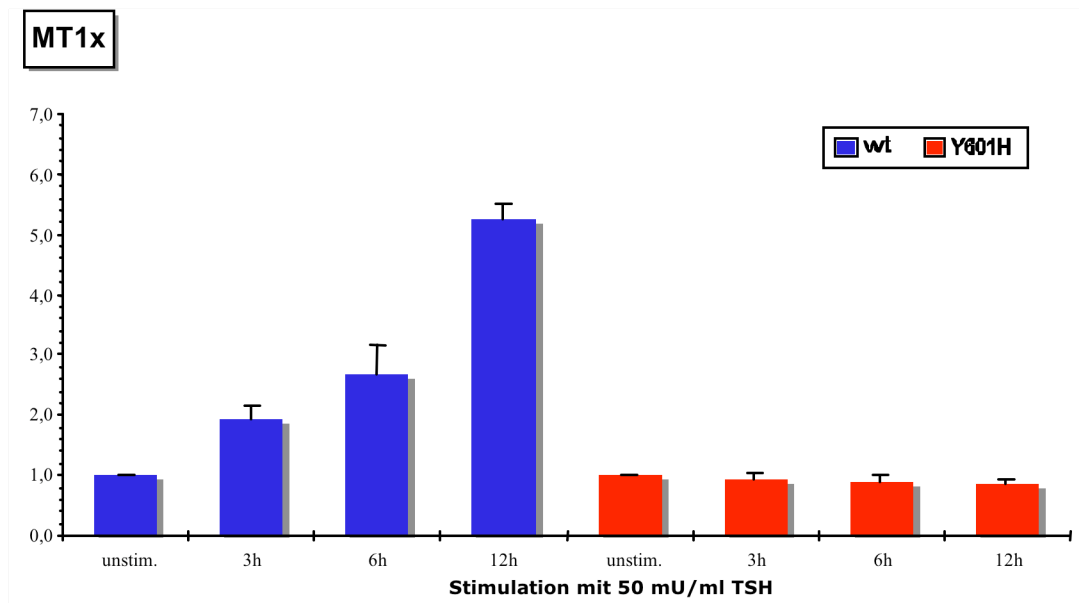


Abbildung 18: Ergebnisse der RTD-PCR; gestutzte Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression von MT1x in Bezug zur unstimulierten Standardprobe (NR) in FTC-133 Zellen (n = 7) mit jeweils  $\beta$ -Aktin als internem Standard

Zuletzt wurden die FTC-133 Zellen mit TSH einer Konzentration von 100 mU/ml stimuliert. Wieder ergab die RTD-PCR einen ähnlichen Befund: Bei FTC-133 wt stieg die NR nach 3 Stunden auf 3, nach 6 Stunden betrug die NR 2,4 und nach 12 Stunden 4,6. Die Zelllinie FTC-133 Y601H im Vergleich dazu zeigte abermals keinerlei Expressionsanstieg von MT1x. (Abbildung 19).

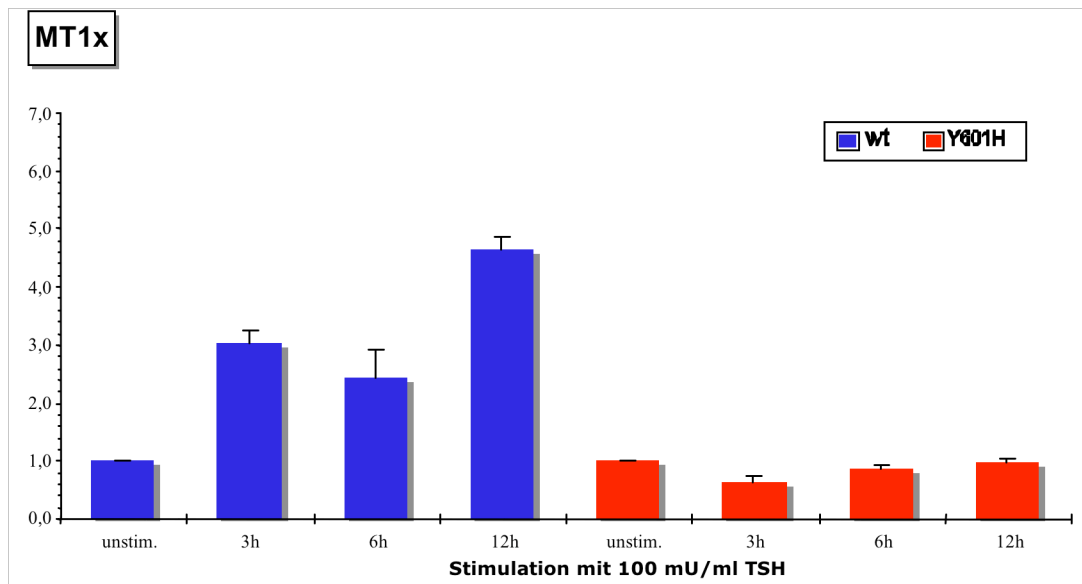


Abbildung 19: Ergebnisse der RTD-PCR; gestutzte Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression von MT1x in Bezug zur unstimulierten Standardprobe (NR) in FTC-133 Zellen (n = 7) mit jeweils  $\beta$ -Aktin als internem Standard

Zusammenfassend ergab sich also, dass die Stimulation des wildtypischen TSHR zu einem robusten Anstieg der MT1x-Transkription bereits nach 3 Stunden führte; ein Effekt der über 12 h hinweg zu beobachten war. Eine intakte  $G_{q/11}$ -Kopplung des TSHR war eine absolut notwendige Voraussetzung für diesen Effekt. Interessanterweise lag die gefundene Induktion der MT1x-Expression in der selben Größenordnung wie sie bereits mittels cDNA-Microarray gefunden worden war, so dass sich die Microarray-Ergebnisse mittels der alternativen Methode der RTD-PCR voll bestätigen ließen.



### *MT1g*

Bei der identischen Versuchsreihe zur Untersuchung von Expressionsunterschieden der Variante MT1g mittels der RTD-PCR wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen FTC-133 wt und FTC-133 Y601H gefunden. Bei der späteren Analyse der Template-Qualität stellte sich heraus, dass diese von niedrigerer Güte waren als jene von den MT1x-Primer, was auf eine geringere Spezifität des MT1g-Primer zurückzuführen ist. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die wenig aussagekräftigen Ergebnisse in dieser Versuchsreihe (MT1g), weswegen diese Primer für spätere Untersuchungen nicht mehr verwendet worden sind.

Nach einer zwölfstündigen TSH-Stimulation (25 mU/ml) nahm die Expressionsstärke sowohl bei FTC-133 wt als auch FTC-133 Y601H ab (auf NR=0,02, bzw. NR=0,25). Nach 3 und auch 6 Stunden fiel die NR bei der FTC-133 wt Zelllinie auf ca. die Hälfte der Standardprobe ab, während die FTC-133 Y601H Zelllinie ungefähr das Niveau der unstimulierten Standardprobe beibehielt (Abbildung 20).

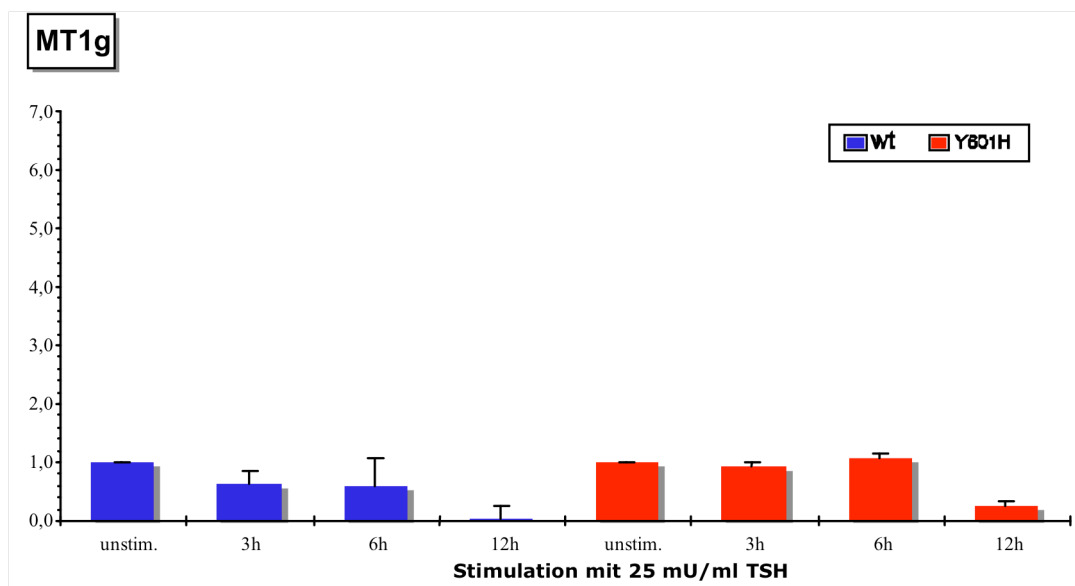


Abbildung 20: Ergebnisse der RTD-PCR; gestutzte Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression von MT1g in Bezug zur unstimulierten Standardprobe (NR) in FTC-133 Zellen (n = 7) mit jeweils  $\beta$ -Aktin als internem Standard

Wenn man die Zellen mit einer TSH-Konzentration von 50 mU/ml stimulierte, erreichte man nach 12 Stunden bei der FTC-133 wt Zelllinie fast eine Verdopplung der relativen Expression der MT1g im Vergleich zu der unstimulierten Probe. In den vorangegangenen Zeitpunkten (3h und 6h) zeigte sich jedoch eine Abnahme der Expressionsstärke auf ca. die Hälfte der NR der unstimulierten Probe. Bei der FTC-133 Y601H Zelllinie zeigte sich nach TSH-Stimulation über die Zeit keine signifikante Expressionsveränderungen (Abbildung 21).

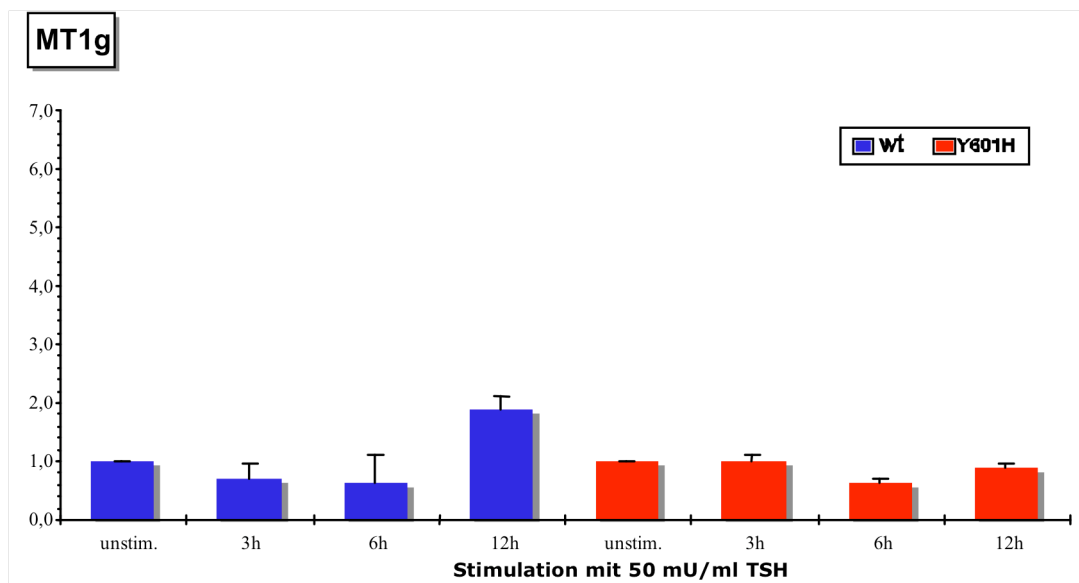


Abbildung 21: Ergebnisse der RTD-PCR; gestutzte Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression von MT1g in Bezug zur unstimulierten Standardprobe (NR) in FTC-133 Zellen (n = 7) mit jeweils  $\beta$ -Aktin als internem Standard

## 5 Ergebnisse

Nach einer Stimulation mit TSH der Konzentration 100 mU/ml stieg die relative Expression von FTC-133 wt auf NR=1,9 (3h), NR=1,5 (6h) und fiel schließlich nach 12 Stunden wieder auf das Niveau der unstimulierten Probe. Bei FTC-133 Y601H gab es nach einem Expressionsabfall von MT1g nach 3h eine Zunahme der Expression um den Faktor 2 im Vergleich zur Standardprobe. Nach 12 Stunden lag die NR bei 0,8 (Abbildung 22).

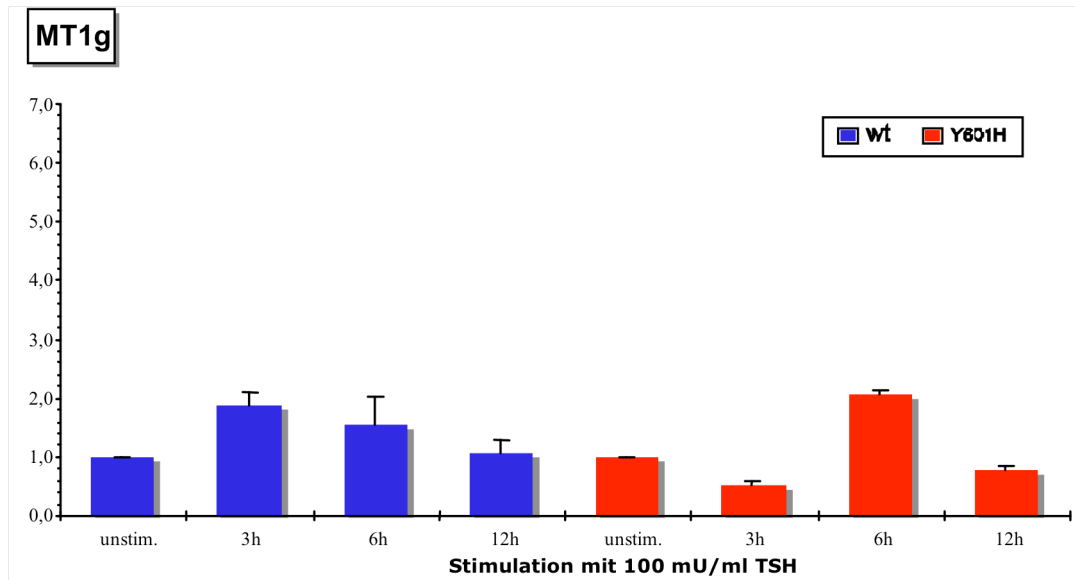


Abbildung 22: Ergebnisse der RTD-PCR; gestutzte Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression von MT1g in Bezug zur unstimulierten Standardprobe (NR) in FTC-133 Zellen (n = 7) mit jeweils  $\beta$ -Aktin als internem Standard

### Concentration Ratio (CR)

Bei der Berechnung der oben angegebenen NR bezog man sich stets auf eine unstimulierte Probe, welche gleich eins gesetzt wurde. Diese Notwendigkeit bei der Berechnung der NR kann jedoch weitere Informationen maskieren. So verlieren die Beträge der Concentration Ratios (CR) ihre Gewichtung, wenn sie für die Berechnung der NR in Verhältnis zueinander gesetzt werden (Abbildung 23).

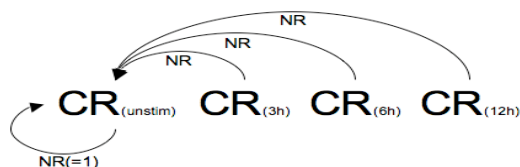


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Berechnung der Normalized Ratio (NR) aus der Concentration Ratio (CR)

Also ist es von Interesse neben den NR auch die einzelnen Ergebnisse der CR zu betrachten. Wie man in Abbildung 24 erkennen kann, kam man beim Vergleich der CR von FTC-133 wt

und FTC-133 Y601H zum Ergebnis, dass TSH bei FTC-133 wt eine MT-Induktion bewirkt, während dies TSH bei FTC-133 Y601H nicht vermag. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von den NR. Eine Maskierung von hohen CR-Beträgen durch die Verrechnung in NR ist somit ausgeschlossen.

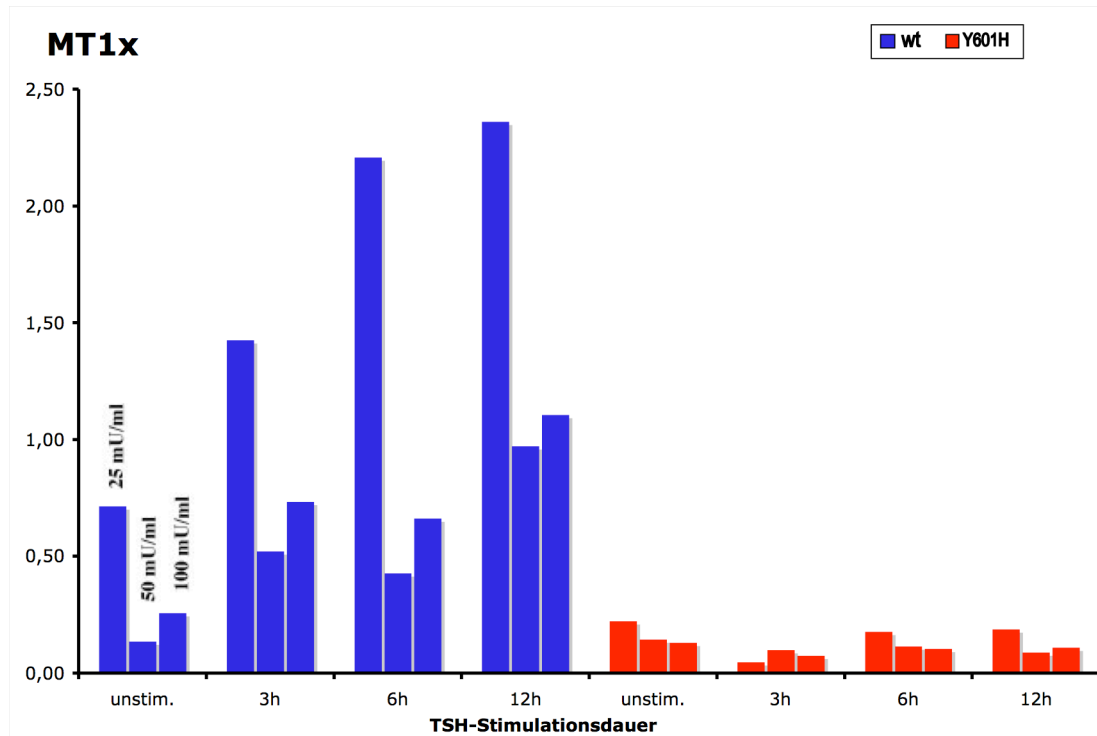


Abbildung 24: Ergebnisse der RTD-PCR; Gestutzte Mittelwerte der Concentration Ratios (CR) von MT1x bei FTC-133 wt, bzw. FTC-133 Y601H

### 5.1.2. Proteinkinase C-abhängige MT1-Regulation

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die MT1-Induktion in kritischer Weise von einem intakten  $G_{q/11}$  Signalweg abhängig ist. Da die Proteinkinase C (PKC) ein essentieller Bestandteil des  $G_{q/11}$  Signalweges ist, wurde weiterführend die Rolle der PKC bei der MT1-Expression untersucht.

Hierfür wurden FTC-133 wt Zellen mit Stimulanzien in Kontakt gebracht, die die PKC beeinflussen. So wurden die Zellen drei, bzw. zwölf Stunden mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, 4  $\mu$ M) inkubiert, einem direkten Stimulator der PKC (Castagna *et al.*, 1982). Bei der dreistündigen PMA-Stimulation wurde das Zellmedium nach drei Stunden durch PMA-freies Medium ersetzt. Dieser Mediumwechsel wurde auch in einem Ansatz ohne PMA nachvollzogen. Neben einer zwölfstündigen TSH-Stimulation (100 mU/ml), wurde die relative Expression von MT1x auch in dem Fall untersucht, bei dem die Zellen zwölf Stunden mit einer Kombination aus TSH (100 mU/ml) und Bisindolylmaleinimid II (10  $\mu$ M) inkubiert

worden waren. Bisindolylmaleinimid II ist ein potenter und spezifischer Inhibitor der PKC (Toullec *et al.*, 1991).

Die Expressionsveränderungen von MT1x wurden wieder als relative Expression von MT1x in Relation zur unstimulierten Probe als NR angegeben, wobei abermals humanes  $\beta$ -Aktin als interner Standard diente. So stieg die Expression von MT1x durch PMA stimuliert nach drei Stunden auf NR=1,5 und nach 12 Stunden auf NR=3,9. Auch durch die reine TSH-Stimulation wurde die Expression von MT1x im Vergleich zur unstimulierten Probe mehr als verdoppelt. Kombinierte man jedoch die TSH-Stimulation mit einem PKC-Inhibitor, so blieb das Expressionsniveau ungefähr auf dem der unstimulierten Probe. Der Mediumwechsel nach drei Stunden bei der unstimulierten Probe verursachte eine Abnahme der NR auf 0,2 (Abbildung 25).

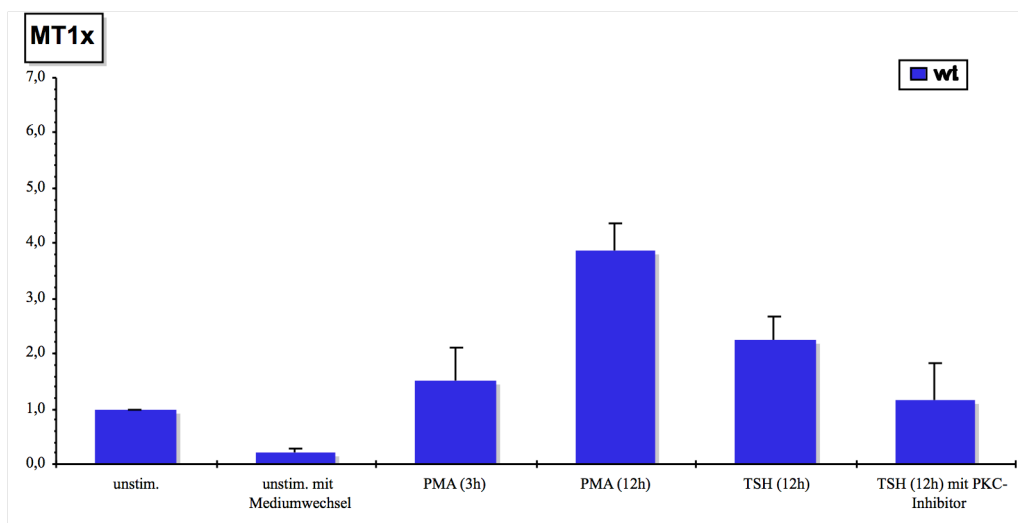


Abbildung 25: Ergebnisse der RTD-PCR; gestutzte Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Expression von MT1x in Bezug zur unstimulierten Standardprobe (NR) in FTC-133 wt Zellen ( $n = 7$ ) mit jeweils  $\beta$ -Aktin als internem Standard (PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; TSH, Thyroidea stimulated hormone; PKC, Proteinkinase-C)

Man kann nun zusammenfassend sagen, dass durch die Bindung von TSH an den TSHR MT1x induziert wird und dass diese Expressionssteigerung durch den  $G_{q/11}$  / PKC-Signalweg vermittelt wird (Abbildung 26). Ungeklärt war nun jedoch, ob die erhöhte Induktion von MT1-Genen nach TSH-Stimulation auch eine erhöhte MT1-Proteinkonzentration in den FTC-133 Zellen nach sich zieht.

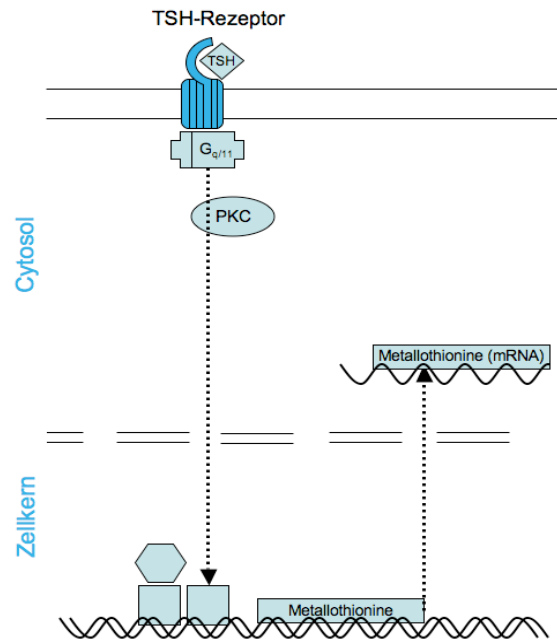


Abbildung 26: Schaubild zur Metallothioninaktivierung durch TSH in Schilddrüsenzellen (PKC, Proteinkinase C; TSH, Thyroid-stimulating hormone)

## 5.2. Regulation der MT-Proteinexpression in FTC-133-Zellen

Um die TSH-abhängige Regulation von Metallothioninen als Protein in FTC-133 Zellen untersuchen zu können, wurden MT-Proteine mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers (Anti MT-AK) sichtbar gemacht. Mittels Western-Blotting sollte zunächst die Spezifität des Antikörpers überprüft und eine Aussage über die Höhe der MT-Expression im Gesamt-Zelllysate getroffen werden; mittels einer zusätzlichen immunhistochemischen Analyse sollten Aussagen zur Homogenität der zellulären Antwort nach Stimulation und zur subzellulären Verteilung von MT1 erzielt werden.

### 5.2.1. TSH-abhängige MT-Induktion

Es wurden Gesamt-Zelllysate von FTC-133 wt Zellen mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend mit einem Anti-MT *mouse* IgG inkubiert. Es handelte sich hierbei um denselben Antikörper wie später in der Immunhistochemie. Im Vorfeld wurden die Zellen 48h mit TSH (100 mU/ml) oder mit CdCl<sub>2</sub> (15 µM) inkubiert, bzw. unstimuliert belassen. Anhand des mit CdCl<sub>2</sub> behandelten Ansatzes sollte das Ausmaß einer maximal erzielbaren MT-Induktion abgeschätzt werden, da Schwermetalle in MT-positiven Zellen zu einem massiven Anstieg der zellulären MT-Spiegel führen (Klaassen *et al.*, 1999). Zur Abschätzung der Proteingrößen wurde eine Proteinleiter (PageRuler Prestained Protein Ladder Plus; Fermentas, St. Leon-Rot) mit den Proben aufgetragen.

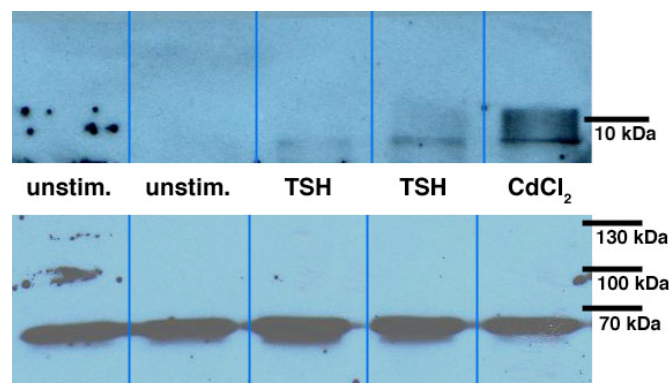


Abbildung 27: Western Blot Analyse zum Nachweis von Metallothioninen {oben} und von ERK2 (MAP-Kinase als Ladekontrolle) {unten} in FTC-133 wt Zellen; Stimulation der Zellen: unstimuliert (48h), TSH (100 mU/ml; 48h) und CdCl<sub>2</sub> (15 µM; 48h)

In der durch CdCl<sub>2</sub> stimulierten Probe konnte man im Vergleich zu den unstimulierten Proben eine starke Induktion der MT erkennen (Abbildung 27). Vergleich man die Lokalisation der

Bande mit der Höhe der Markerproteine, so konnte man abschätzen, dass das detektierte Protein <10 kDa groß ist. Bei der sichtbaren leichten Antikörperbindung vor der eigentlichen MT-Bande könnte es sich um MT-Multimere handeln, da MT intermolekulare Cysteinbrücken bilden können. Weitere Proteinbanden wurden nicht detektiert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der MT-Antikörper spezifisch MT bindet.

Als Ladekontrolle wurde die Nitrozellulosemembran nach Ablösen der Antikörper mit Anti-ERK2 *rabbit* IgG inkubiert. Da die Proteinmenge von ERK2 (MAP-Kinase) in allen Zellen gleich groß ist und die detektierten Bandenstärken gleiche Intensitäten aufwiesen, ist davon auszugehen, dass sich in den einzelnen Proben die gleiche Menge an Protein befand (Abbildung 27).

Auch bei den TSH-stimulierten Proben ließ sich im Vergleich zu der unstimulierten Probe eine verstärkte Expression von MT nachweisen (Abbildung 27). Diese Induktion der MT war jedoch nicht so ausgeprägt wie nach CdCl<sub>2</sub>-Stimulation.

### 5.2.2. Subzelluläre Verteilung von MT

Um in der Immuncytochemie MT nachweisen zu können, wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie sowie ein weiteres Mal der spezifischen Anti-MT *mouse* IgG AK verwendet. Als Fluoreszenzfarbstoff diente Fluoresceinisothiocyanat (FITC), welcher an einem Anti-Mouse-AK gekoppelt war. Die Zellen (FTC-133 wt und FTC-133 Y601H) wurden 48 Stunden lang mit TSH (100 mU/ml), bzw. mit CdCl<sub>2</sub> (15 µmol/l) stimuliert. Außerdem wurde zum Vergleich eine unstimulierte Probe gefärbt. Bei einer zweiten unstimulierten Probe wurde die Inkubation mit dem 1. Antikörper (MT-Antikörper) ausgelassen, um die basale Hintergrundfluoreszenz beurteilen zu können (Tabelle 4).

Tabelle 4: Stimulationsschema der FTC-133 Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie

<b>FTC-133 wt</b>	Unstimuliert	Unstimuliert ohne 1. AK	CdCl <sub>2</sub> (15 µM)	TSH (100 mU/ml)
<b>FTC-133 Y601H</b>	Unstimuliert	Unstimuliert ohne 1. AK	CdCl <sub>2</sub> (15 µM)	TSH (100 mU/ml)

Die Proben wurden unter einem konfokalen Laserscannmikroskop (LSM 510 Meta mit AxioCam HR; Zeiss, Jena), sowie einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M; Zeiss, Jena) im Hellfeld und bei Stimulation mit Licht der Wellenlänge 490 nm untersucht (Anregungswellenlänge FITC).



Vergleicht man nun die FTC-133 wt Proben, so stellt man zunächst fest, dass Zellen der unstimulierten Probe im Vergleich zu Zellen der Probe, welche nicht mit MT-spezifischen AK inkubiert wurden, eine höhere Basalfluoreszenz aufweisen. Dies lässt darauf schließen, dass der Sekundärantikörper keine wesentliche unspezifische Hintergrundfluoreszenz erzeugte. Vergleicht man daraufhin Zellen der unstimulierten Probe mit Zellen, welche mit  $\text{CdCl}_2$  inkubiert wurden, so erkennt man einen prononcierten Anstieg der Fluoreszenz in ca. einem Drittel der Zellen.  $\text{CdCl}_2$  induziert also die Produktion von MT (Abbildung 28).

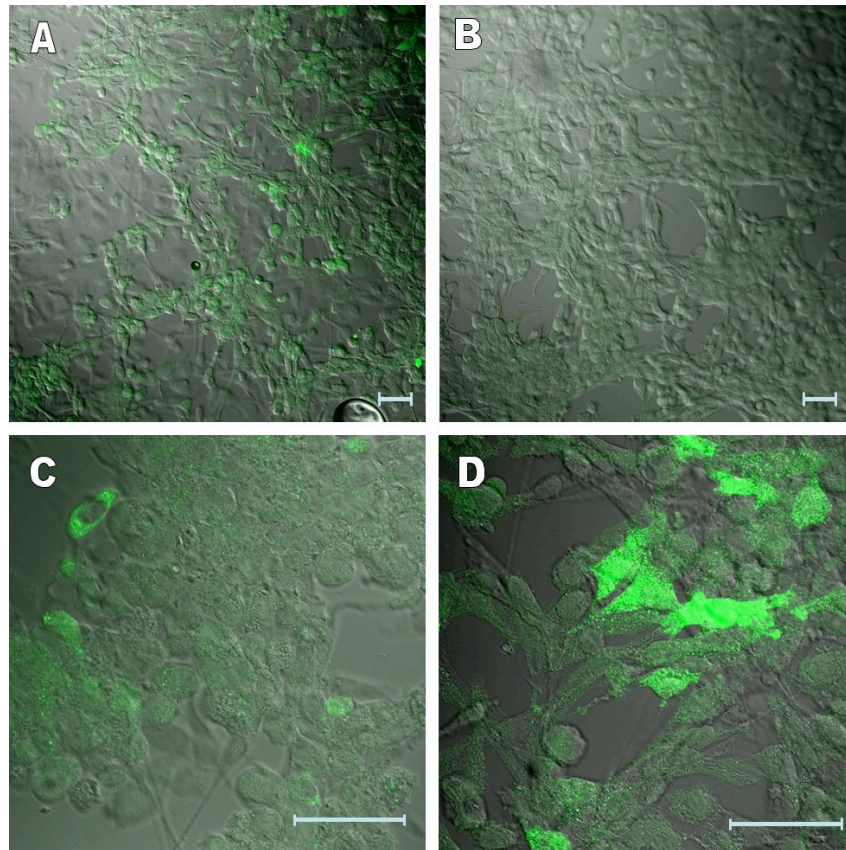


Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (FITC) von FTC-133 wt; Overlay (Dunkelfeld & bei 490 nm; LSM 510 Meta). Die Größenmaßstäbe definieren jeweils 50 µm. **A)** unstimulierte Probe, **B)** unstimulierte Probe ohne 1. AK, **C)** unstimulierte Probe, **D)**  $\text{CdCl}_2$ -stimulierte Probe (15 µM; 48h)

Bei der unstimulierten Probe von FTC-133 Y601H ist auch eine Basalfluoreszenz zu beobachten, welche von einer basalen MT-AK-Bindung ausgeht. Bei der Probe, welche nicht mit MT-AK inkubiert wurde, zeigte sich kaum Fluoreszenz. Man kann ungefähr 30% an fluoreszierenden Zellen in den mit  $\text{CdCl}_2$  stimulierten Proben nachweisen (Abbildung 29). Hier liegt erneut eine massive Expressionssteigerung von MT-Protein vor.

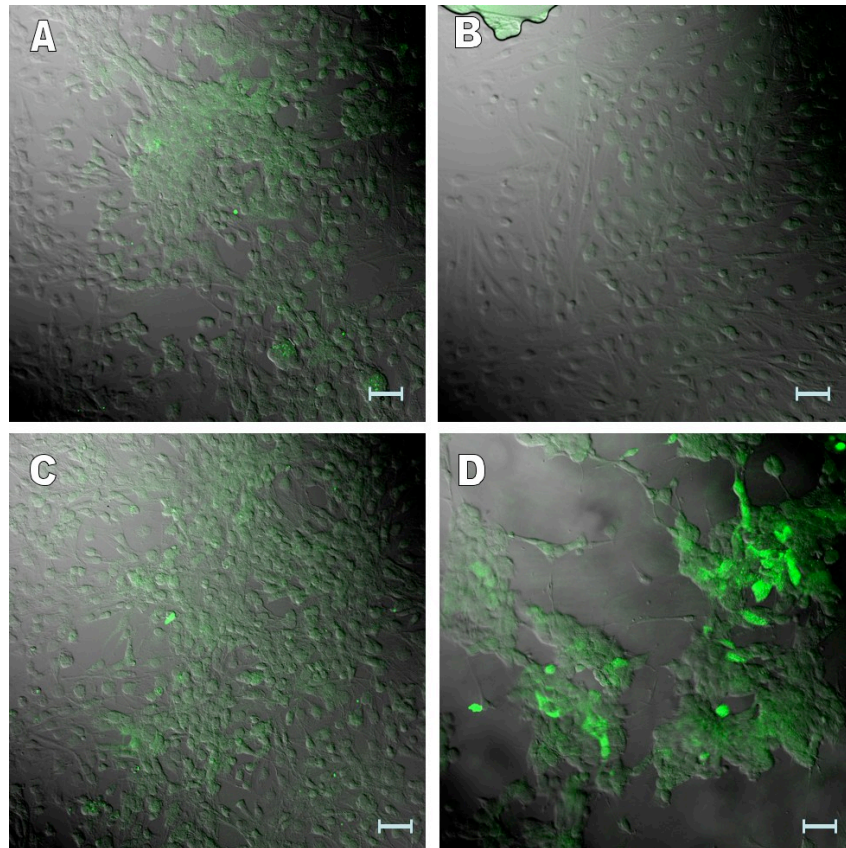


Abbildung 29: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (FITC) von FTC-133 Y601H; Overlay (Dunkelfeld & bei 490 nm; LSM 510 Meta). Die Größenmaßstäbe definieren jeweils 50  $\mu\text{m}$ . **A)** unstimulierte Probe, **B)** unstimulierte Probe ohne 1. AK, **C)** unstimulierte Probe, **D)**  $\text{CdCl}_2$ -stimulierte Probe (15  $\mu\text{M}$ ; 48h)

So kann man zunächst festhalten, dass auf der einen Seite vergleichbare basale MT-Signale sowohl in FTC-133 wt als auch in FTC-133 Y601H zu beobachten sind. Auf der anderen Seite steigt die MT-Expression nach  $\text{CdCl}_2$ -Stimulation bei beiden Zelllinien vergleichbar stark. Interessanterweise steigt die Expression von MT nur in einem Teil der Zellen, was auf eine inhomogene Responsibilität der Zellen auf den unspezifischen Stimulus ( $\text{CdCl}_2$ ) schließen lässt. Man könnte sich vorstellen, dass hier zyklusabhängige Zellvorgänge eine Rolle spielen.



Im zweiten Schritt wurden unstimulierte Proben mit TSH-stimulierten Proben verglichen. Inkubierte man FTC-133 wt Zellen 48h mit TSH (100mU/ml), so zeigte sich im Vergleich zu unstimulierten Proben eine starke Zunahme an fluoreszierenden Zellen (insgesamt ca. die Hälfte der Zellen)(Abbildung 30, Abbildung 31). TSH ist also in der Lage die Translation von MT zu induzieren.

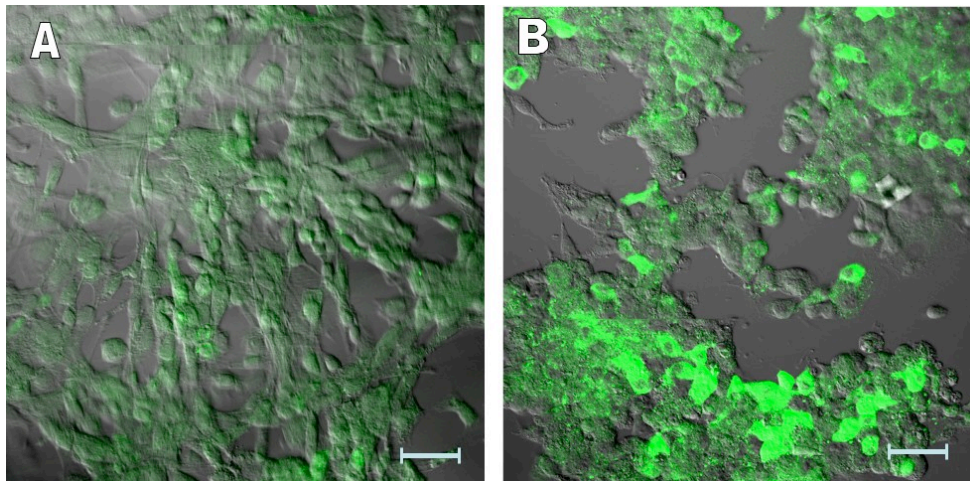


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (FITC) von FTC-133 wt; Overlay (Dunkelfeld & bei 490 nm; LSM 510 Meta). Die Größenmaßstäbe definieren jeweils 50 µm. **A)** unstimulierte Probe, **B)** TSH-stimulierte Probe (100 mU/ml; 48h)

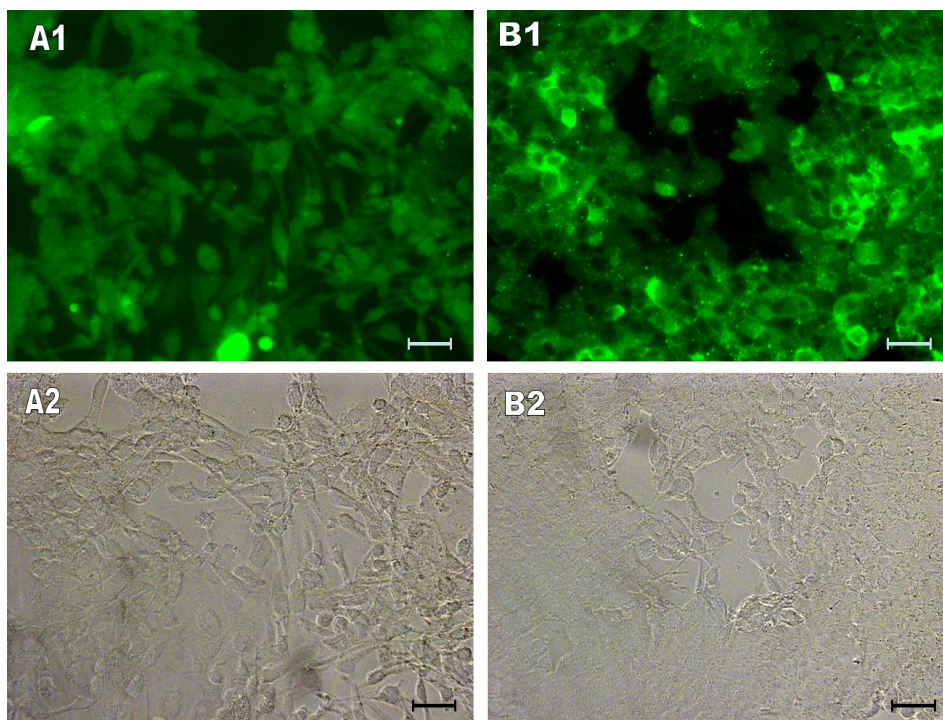


Abbildung 31: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (FITC) von FTC-133 wt. Die Größenmaßstäbe definieren jeweils 50 µm. **A1)** unstimulierte Probe (bei 490 nm), **B1)** TSH-stimulierte Probe (100 mU/ml; 48h) (bei 490 nm), **A2)** unstimulierte Probe (Hellfeld), **B2)** TSH-stimulierte Probe (100 mU/ml; 48h) (Hellfeld)

Desweiteren wurden TSH-stimulierte Proben von FTC-133 Y601H untersucht. Hier konnte man weder eine Zu- noch eine Abnahme an fluoreszierenden Zellen finden (Abbildung 32, Abbildung 33). Bei FTC-133 Y601H mit der Mutante des TSHR, welche unfähig ist das  $G_{q/11}$ -Protein zu koppeln, fand also keine Expressionssteigerung der MT statt.

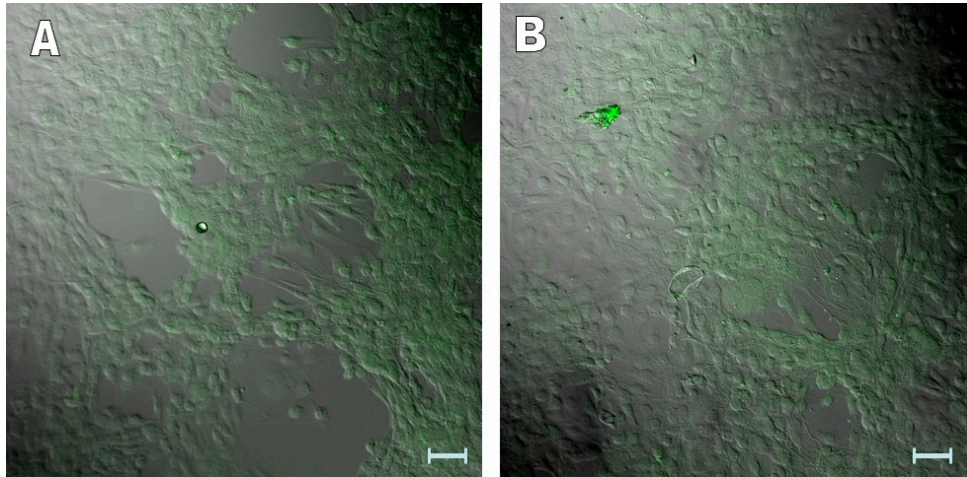


Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (FITC) von FTC-133 Y601H; Overlay (Dunkelfeld & bei 490 nm; LSM 510 Meta). Die Größenmaßstäbe definieren jeweils 50  $\mu\text{m}$ . **A)** unstimulierte Probe, **B)** TSH-stimulierte Probe (100 mU/ml; 48h)

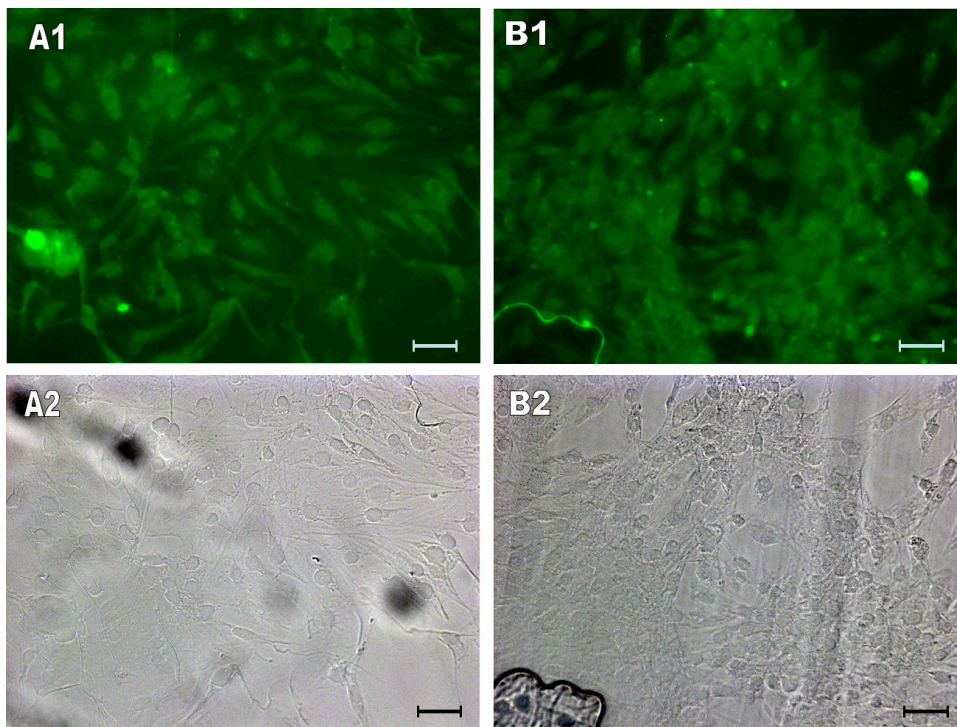


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (FITC) von FTC-133 Y601H. Die Größenmaßstäbe definieren jeweils 50  $\mu\text{m}$ . **A1)** unstimulierte Probe (bei 490 nm), **B1)** TSH-stimulierte Probe (100 mU/ml; 48h) (bei 490 nm), **A2)** unstimulierte Probe (Hellfeld), **B2)** TSH-stimulierte Probe (100 mU/ml; 48h) (Hellfeld)



Diese Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigen auf, dass TSH in FTC-133 Zellen die Translation von MT zu induzieren vermag. Diese Stimulation von TSH wird durch den TSHR vermittelt und zwar mit Hilfe des  $G_{q/11}$ -Proteins. Zusammen mit den Ergebnissen aus der RTD-PCR (siehe 5.1) ergibt sich der in Abbildung 34 dargestellte Mechanismus.

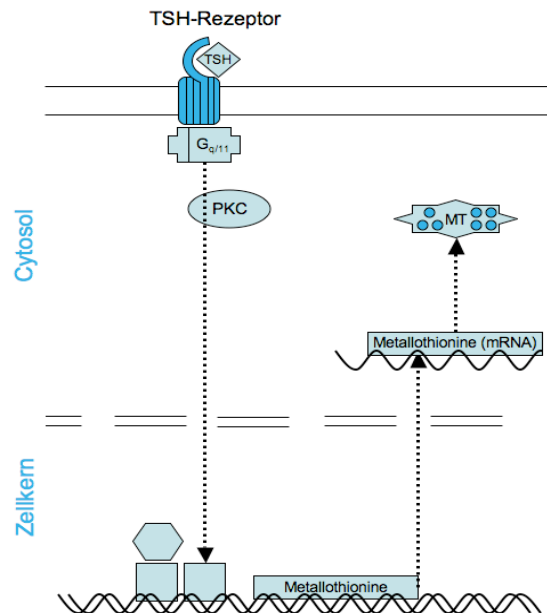


Abbildung 34: Schaubild zur Metallothioninaktivierung durch TSH in Schilddrüsenzellen, inkl. Translation von MT-mRNA zum MT-Protein (PKC, Proteinkinase C; TSH, Thyroid-stimulating hormone)

### 5.3. Der JAK/STAT-Signalweg in Schilddrüsenkarzinomzellen

Der Janus Kinase / signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT)-Signalweg ist ein wichtiger intrazellulärer Signalweg bei Zelldifferenzierung und Zellwachstum, wobei er für eine Reihe von Cytokinen und Wachstumsfaktoren einer der Hauptsignalwege ist (Rawlings *et al.*, 2004). Park *et al.* konnten 2002 zeigen, dass auch der TSHR die Fähigkeit besitzt, den JAK/STAT-Pathway zu aktivieren (Park *et al.*, 2002). Weitere Versuche zeigten auf, dass der  $G_{q/11}$ /PKC-Signalweg des TSHR die zentrale Rolle in der Phosphorylierung des untersuchten STAT3 spielt, da durch Inhibierung der PKC keine STAT3-Aktivierung stattfand (Darnell, 1997; Park *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002).

Lee *et al.* konnten nun an Mäusen nachweisen, dass eine Interleukin-6 induzierte MT-Aktivierung in Zusammenhang mit STAT1 und STAT3 steht. Sie konnten *in vitro* aufzeigen, dass nach Stimulation mit Interleukin-6 STAT-Moleküle vermehrt in der Promoterregion von MT zu finden sind (Lee *et al.*, 1999). In Herzmuskelzellen konnte von Oshima *et al.* unter

ischämischen Bedingungen eine STAT3 vermittelte MT-Aktivierung nachgewiesen werden (Oshima *et al.*, 2005). So kann man nun auch in FTC-133 Zellen eine solche TSH und  $G_{q/11}$ -abhängige STAT-Aktivierung vermuten. Eine derartige Rekrutierung der STAT-Signalkaskade durch TSH könnte wiederum in einer MT-Induktion einmünden.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden FTC-133 Proben (wt / Y601H) durch Western-Blotting und einem Anti-phosphoSTAT *rabbit* IgG, welcher phosphorylierte und damit aktivierte STAT-Proteine bindet, untersucht. Bei dem Vergleich von FTC-133 wt und FTC-133 Y601H zeigte sich bei beiden Proben eine Aktivierbarkeit der STAT durch TSH, wobei bei der Zelllinie FTC-133 wt eine vermehrte und stärkere STAT-Aktivierung vorlag (Abbildung 35). Außerdem kann man aus den Ergebnissen erkennen, dass FTC-133 wt Zellen eine höhere Grundaktivität der STAT aufweisen.

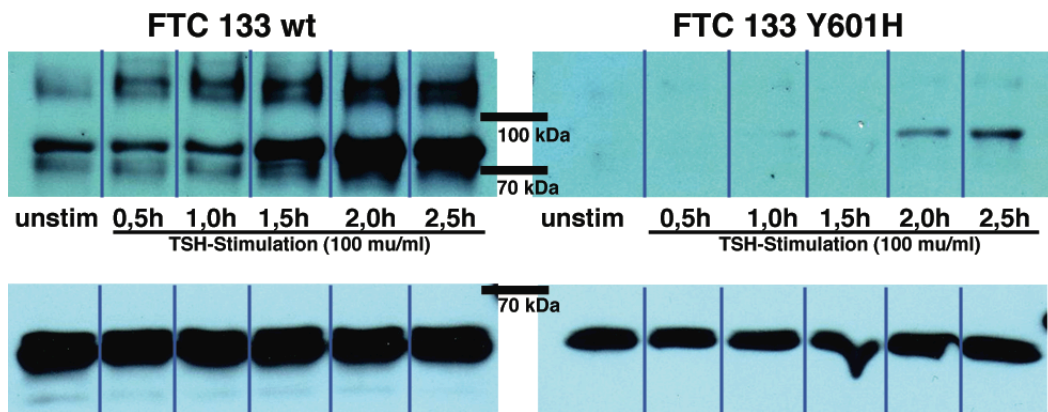


Abbildung 35: Western Blot Analyse zum Nachweis von phospho-STAT {oben} und von ERK2 (MAP-Kinase, als Ladekontrolle) {unten} in FTC-133 wt Zellen; Stimulation der Zellen: unstimuliert (2,5h) und TSH (100 mU/ml)

#### 5.4. MT in primären Schilddrüsenzellen

Neben den differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen FTC-133 wurde auch eine Zelllinie auf ihre MT-Expression untersucht, welche endogen einen funktionstüchtigen TSHR exprimiert; die primäre Schilddrüsenzelllinie *SD-191*. Die Zellen wurden unter identischen Bedingungen kultiviert, wie FTC-133. Unter Zuhilfenahme des selben MT-Antikörpers wurde auch hier ein Immunoblotting, sowie eine Immunfluoreszenzfärbung der kultivierten Zellen vorgenommen. Man verfolgte das Ziel unter verschiedenen Stimulationsbedingungen die Stärke der Translation von MT abschätzen zu können.

Um zu testen, ob TSH auch in SD-191 Zellen auf Proteinebene MT induziert, wurde nach 24-, bzw. 48-stündiger TSH-Inkubation versucht, diese MT-Aktivierung mit der Methode des Western-Blotting nachzuweisen. Zusätzlich wurde eine Probe mit TSH und mit einem PKC-Inhibitor (Bisindolylmaleinimide II; 10  $\mu$ M) 48 Stunden lang inkubiert. Eine unstimulierte Probe diente als Vergleichsmöglichkeit.

Auf diese Art und Weise konnte man eine TSH-induzierte Induktion von MT in SD-191 aufzeigen, welche ihr Maximum schon nach 24 Stunden erreichte (Abbildung 36). Vergleicht man nun zusätzlich die Probe, welche 48 Stunden nur mit TSH inkubiert worden war, mit der Probe, welche zusätzlich einem PKC-Inhibitor ausgesetzt worden war, so stellt man fest, dass die Probe mit dem PKC-Inhibitor weniger MT-Aktivität aufweist (Abbildung 36). So kann man schlussfolgern, dass die MT-Induktion mit der PKC in Zusammenhang steht.

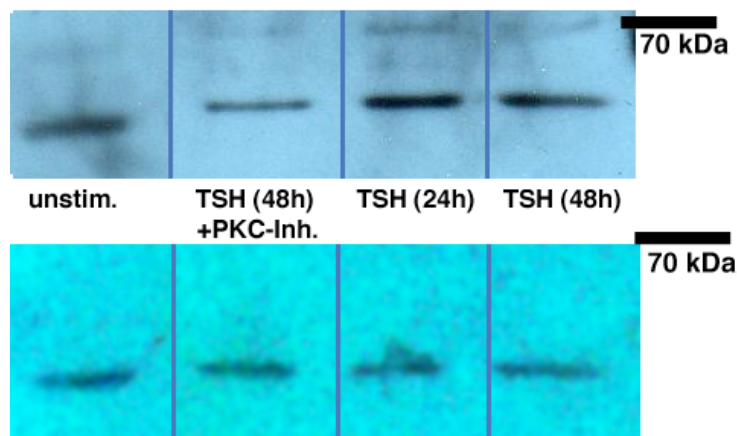


Abbildung 36: Western Blot Analyse zum Nachweis von Metallothioninen {oben} und von ERK2 (MAP-Kinase als Ladekontrolle) {unten} in SD-191 Zellen; Stimulation der Zellen: unstimuliert (48h), TSH (100 mU/ml; 48h) mit PKC-Inhibitor (Bisindolylmaleinimide II; 10  $\mu$ M), TSH (100mU/ml; 24h) und TSH (100 mM/ml; 48h)

In der Immuncytochemie wurde eine Probe mit TSH (50 mU/ml), eine weitere mit  $\text{CdCl}_2$  (1  $\mu$ M) stimuliert. Zwei Proben blieben unstimuliert, wobei nur eine der beiden unstimulierten

Proben mit dem MT-Antikörper inkubiert wurde. So kann die Autofluoreszenz des Zweitantikörpers abgeschätzt werden. In dieser Kontroll-Probe konnte später keinerlei Fluoreszenz in den Zellen detektiert werden. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der eigentlichen Proben wurden alle unter gleichen Bedingungen aufgenommen. So ist gewährleistet, dass die jeweils detektierte Fluoreszenzintensität auch als valides Maß für die Höhe der MT-Expression dient. Die Inkubationszeit war bei allen Proben jeweils 48 Stunden.

Zunächst wurde die unstimulierte Probe mit Hilfe des LSM 510 Meta betrachtet. Es zeigte sich eine geringe Basalfluoreszenz der Zellen, wobei die Zellkerne stets keine Fluoreszenz aufwiesen (Abbildung 37). Dies lässt auf eine basale Expression von MT in SD-191 und hauptsächliche Expression im Zytosol schließen.

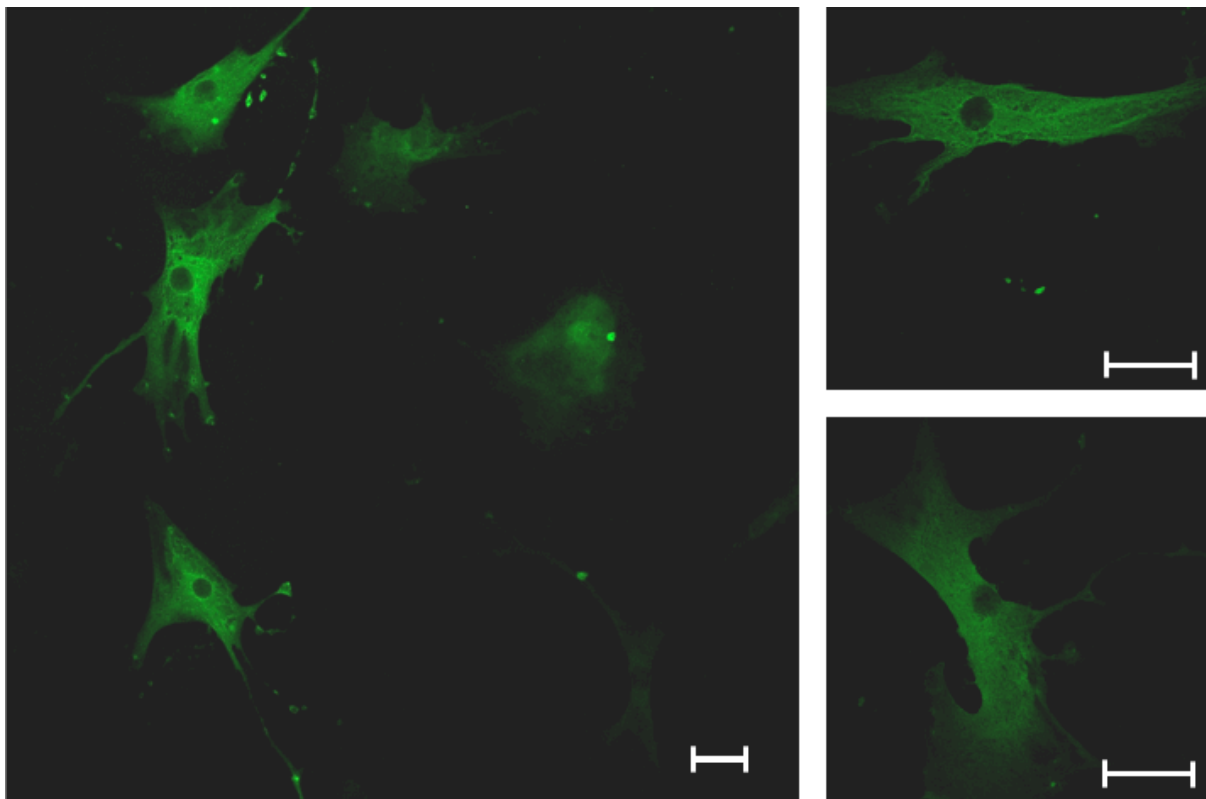


Abbildung 37: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (FITC) von SD-191; bei 490 nm; LSM 510 Meta. Die Größenmaßstäbe definieren jeweils 50 µm; *unstimulierte Probe (48h)*.



Im zweiten Schritt wurden die SD-191 Zellen betrachtet, welche 48h lang mit  $\text{CdCl}_2$  inkubiert worden waren. Diese Zellen wiesen eine starke Fluoreszenz auf, wobei abermals die Zellkerne ausgespart blieben (Abbildung 38). Bei der mikroskopischen Betrachtung der Proben fiel auf, dass die fixierten SD-191 Zellen in zwei verschiedenen Zellstrukturen vorkamen. Ein Zelltyp war flach, groß und mit kurzen Zellausläufern. Der andere Zelltyp war schmaler, kleiner und mit langen dünnen Zellausläufern. Dieser letztere Typ von Zelle wies stets eine höhere Fluoreszenz auf. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass durch eine kleinere und kompaktere Struktur der Zelle eine nur relativ höhere Konzentration an MT detektiert worden war. Im Vergleich zu den FTC-133 Zellen kann man festhalten, dass die SD-191 Zellen reagibler auf den  $\text{CdCl}_2$ -Stimulus zu sein scheinen.

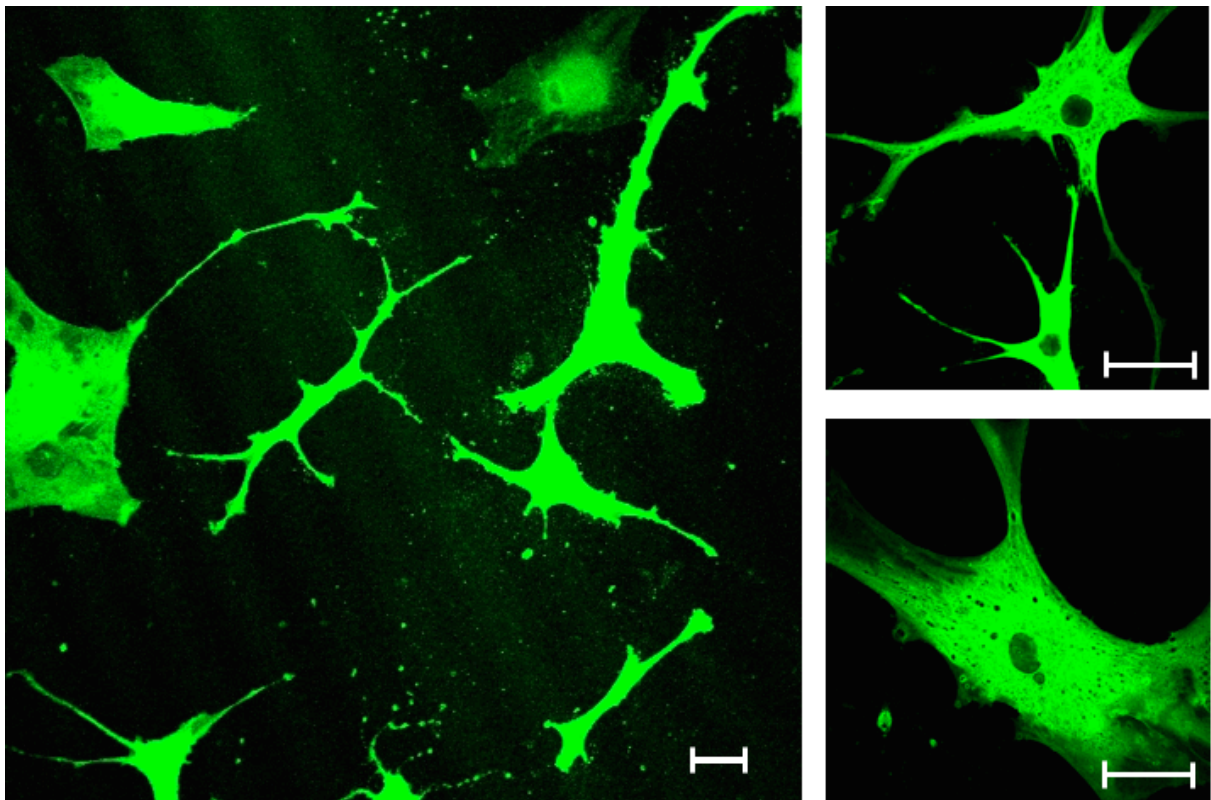


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (FITC) von SD-191, bei 490 nm; LSM 510 Meta. Die Größenmaßstäbe definieren jeweils 50  $\mu\text{m}$ ;  $\text{CdCl}_2$ -stimulierte Probe (1  $\mu\text{M}$ , 48h).

Zuletzt wurden die TSH-stimulierten Proben betrachtet. Hier zeigte sich eine im Vergleich zu den unstimulierten Proben gesteigerte Fluoreszenz der Zellen (Abbildung 39). Dies lässt den Schluss zu, dass TSH in SD-191 eine MT-Induktion auszulösen vermag. Der Fluoreszenzanstieg war jedoch nicht so ausgeprägt wie in den  $\text{CdCl}_2$ -stimulierten Proben. Das intrazelluläre Verteilungsmuster war ähnlich des der anderen Proben. Auch hier wies der Zellkern erneut keine Fluoreszenz auf.

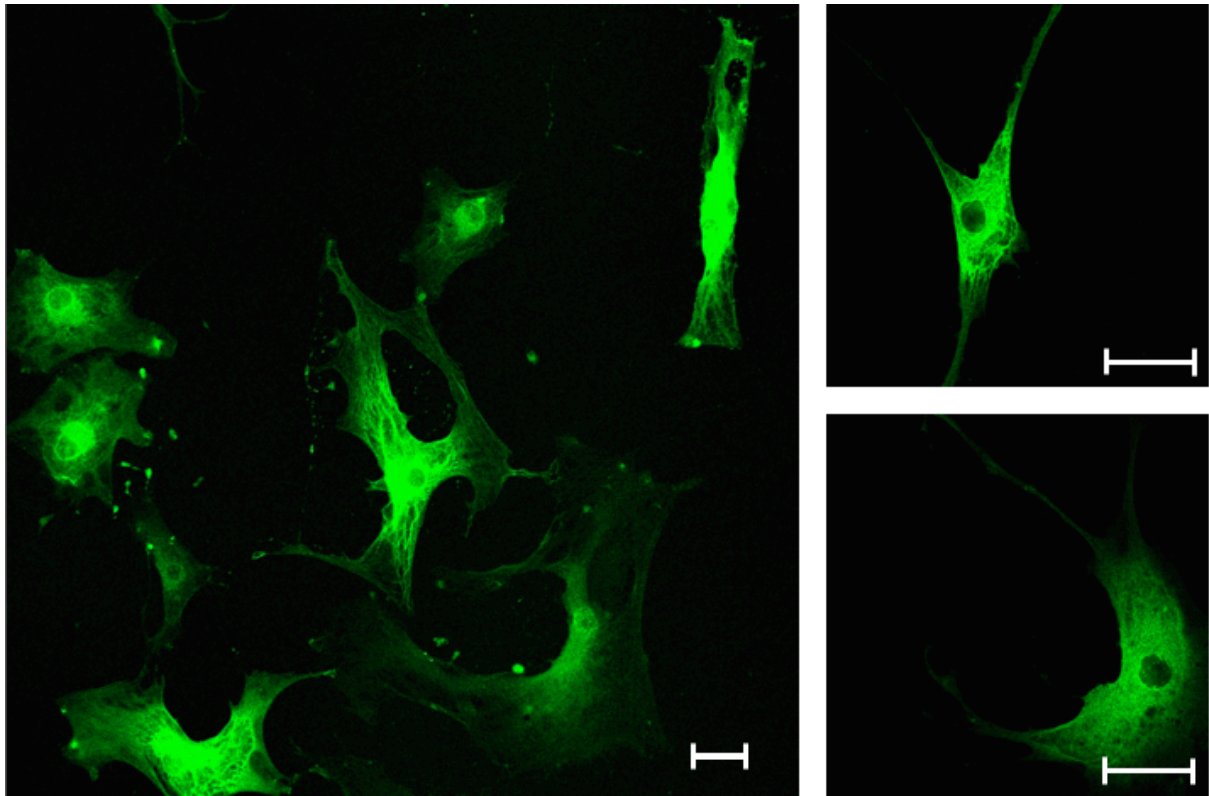


Abbildung 39: Fluoreszenzmikroskopische Bilder (FITC) von SD-191 bei 490 nm; LSM 510 Meta. Die Größenmaßstäbe definieren jeweils 50  $\mu\text{m}$ ; *TSH-stimulierte Probe (50 mU/ml, 48h)*.

Bei höher vergrößerten Aufnahmen (Abbildung 40), kann man durch die Struktur der Antikörperbindung das Verteilungsmuster der MT erkennen. Besonders gut war dieses bei  $\text{CdCl}_2$ -Stimulation zu beurteilen. So scheinen die MT sich entlang des zellkernnahen endoplasmatischen Retikulums (ER) zu konzentrieren, wobei der Zellkern stets keine Fluoreszenz und somit keine MT aufwies. Man bekommt außerdem den Eindruck, dass sich die MT submembranär verstärkt akkumulieren.

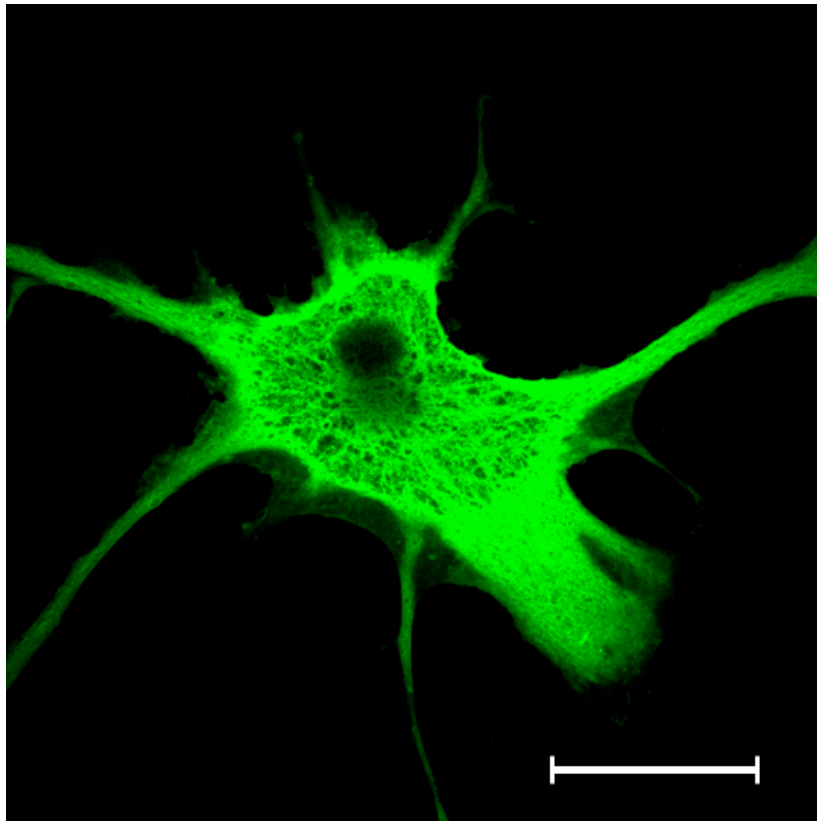


Abbildung 40: Fluoreszenzmikroskopisches Bild (FITC) von SD-191, bei 490 nm; LSM 510 Meta. Der Größenmaßstab definiert 50 µm;  $\text{CdCl}_2$ -stimulierte Probe (1 µM, 48h). Verkürzte Belichtungsdauer und veränderte Aufnahmetechnik im Vergleich zu Abbildung 38 zur verbesserten Darstellung der subzellulären Proteinverteilung

## 6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden  $G_{q/11}$ -abhängige Signalwege des TSHR untersucht. Hintergrund dieser Untersuchung ist die Tatsache, dass der TSHR die Fähigkeit besitzt, alle 4 Mitglieder der G-Protein-Familie zu aktivieren ( $G_s$  /  $G_{i/o}$  /  $G_{12/13}$  /  $G_{q/11}$ ), wobei die Funktion  $G_{q/11}$ -abhängiger Signalwege in Schilddrüsenzellen weitgehend ungeklärt ist. Die physiologische Bedeutung der  $G_{q/11}$ -gesteuerten Signalwege des TSHR wird von manchen Autoren sogar in Frage gestellt (Allgeier *et al.*, 1994; Allgeier *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1999).

So weisen verschiedene Quellen darauf hin, dass die  $G_s$ -Protein gesteuerten Signalkaskaden der zentrale Regulationsmechanismus in Schilddrüsenzellen sind, und dass dem  $G_{q/11}$ -Protein kaum Funktionen wie zum Beispiel bei der Hormonsynthese, Differenzierung und Schutz vor Entartung zugeschrieben werden können. Begründet wird dies in der Literatur durch verschiedene Beobachtungen. So konnten Allgeier *et al.* aufzeigen, dass der TSHR von Hunden physiologischer Weise zwar das  $G_{q/11}$ -Protein bindet, aber keinerlei  $IP_3$ -Anstieg vermitteln kann; ohne dass die Schilddrüse funktionelle Einbußen hinnehmen muss (Allgeier *et al.*, 1997). Ein weiterer Hinweis auf die Vorherrschaft des  $G_s$ -Proteins ist der, dass ein inaktives cAMP response element binding protein (CREB) eine weitestgehend inaktive Schilddrüsenzelle nach sich zieht (Nguyen *et al.*, 2000). Das CREB ist ein bZIP Transkriptionsfaktor, welcher in die  $G_s$ -Protein / PKA Signalkaskade integriert ist (Rosenberg *et al.*, 2002). So konnten Nguyen *et al.* aufzeigen, dass eine defizientes CREB in Schilddrüsenzellen von transgenen Mäusen eine Hypothyreose verursacht. Neben dieser Funktionseinbuße war die Schilddrüse auch in Wachstum und Differenzierung gehemmt (Nguyen *et al.*, 2000). Außerdem zeigten Murakami *et al.* auf, dass in der Entstehung von Schilddrüsenadenomen eine Mutation im  $G_s$ -Protein, welche eine Daueraktivierung des G-Proteins zur Folge hat, die zentrale Ätiologie zu sein scheint (Murakami *et al.*, 1999). Eine zusätzliche Mutation, welche die Aktivität des  $G_{q/11}$ -Proteins verändert ist nach Murakami *et al.* nicht erforderlich. Dies ist eine Meinung, welche von anderen Autoren, wie zum Beispiel Derwahl *et al.*, nicht unterstützt wird. Sie sehen vielmehr eine multifaktorielle Ätiologie als Grund für Schilddrüsenfunktionsstörungen (Derwahl *et al.*, 1996; Grasberger *et al.*, 2007).

So zeigen neuere Erkenntnisse sehr wohl eine physiologische Funktion des  $G_{q/11}$ -Proteins des TSHR (Ringel *et al.*, 1998; Grasberger *et al.*, 2007). So konnten Wettschureck *et al.* 2007 anhand einer gendefizienten Maus, bei welcher das Gen für das  $G_q$ - und  $G_{11}$ -Protein

gewebsspezifisch in der Schilddrüse deletiert wurde, zeigen, dass diese Mausfamilie u.a. eine starke Hypothyreose und Hyperparathyreodismus entwickelte (Wettschureck *et al.*, 2007). So muss ein  $G_{q/11}$ -abhängiger Signalweg für die Hormonsynthese und / oder Hormonfreisetzung eine zentrale Rolle spielen. Ungeklärt blieb jedoch, ob ein  $G_{q/11}$ -gesteuerter Signalweg des TSHR diese Hypothyreose verursachte, oder ob eine allgemeine  $G_{q/11}$ -Insuffizienz in Thyreozyten der Grund dafür war. Ein Hinweis hierfür lieferten Grasberger *et al.*, welche eine Familie mit vererbter eingeschränkter  $IP_3/Ca^{2+}$ -Antwort in Schilddrüsenzellen untersuchten. Diese Patienten wiesen eine latente Hypothyreose mit erhöhten TSH-Werten und erhöhter Iodidaufnahme bei euthyreoter Stoffwechsellaage auf. Grassberger *et al.* argumentierten, dass eine verringerte  $IP_3$ -Produktion, welche ein Teil der  $G_{q/11}$ -Signalkaskade ist, eine Verringerung der Hormonsynthese nach sich ziehe. Dieses Stimulationsdefizit in der Schilddrüsenzelle wird durch eine vermehrte Iodidaufnahme und einen dadurch vermehrtem Antrieb zur Hormonsynthese kompensiert. Diese Iodidaufnahme und Stimulation zur Hormonsynthese wird nach Grasberger *et al.* durch TSH, den TSHR und der  $G_s$ -Protein-gekoppelte Signalkaskade vermittelt (Grasberger *et al.*, 2007). Hier konnte das erste Mal eine physiologische Bedeutung des  $G_{q/11}$ -Protein abhängigen Signalweges in vivo beim Menschen nachgewiesen werden.

Der TSHR und seine Signalkaskaden regulieren beim Menschen u.a. Differenzierung und Proliferation von Schilddrüsenzellen. Es stellt sich die Frage, ob außer  $G_s$ -Protein-gekoppelten Signalwegen auch andere G-Proteine wichtig für die Genregulation sind. So ist es sinnvoll genaueres Augenmerk auf die TSHR-gesteuerte Genexpression und seine Signalkaskaden zu legen. So konnten Büch *et al.* 2008 erstmals eine  $G_{13}$ -Protein-abhängige Induktion der p44/42 Mitogen aktivierender Proteinkinase (MAPK) nachweisen (Buch *et al.*, 2008). Gleichzeitig wies man nach, dass die MAPK-Aktivierung unabhängig von  $G_s$ -,  $G_i$ - oder  $G_{q/11}$ -Proteinen ist. Desweiteren wurden von Hara *et al.* bei mit Pertussistoxin behandelten Zellen  $G_{i/o}$ -Protein-abhängige Signalwege für die TSH-induzierte Aktivität der „c-Jun-terminal kinase“ verantwortlich gemacht (Hara *et al.*, 1999). Dies sind Beweise dafür, dass bei der Genregulation neben dem  $G_s$ -Protein auch andere G-Protein-gekoppelte Signalwege des TSHR entscheidende Bedeutung zukommt.

Um  $G_{q/11}$ -Protein-regulierte Gene der Schilddrüse zu detektieren wurde in dieser Arbeit eine Schilddrüsenzelllinie verwendet, bei welcher genau dieser  $G_{q/11}$ -Protein abhängige Signalweg des TSHR nicht aktivierbar ist. Eine Punktmutation (Y601H) des TSHR verhindert hier eine  $G_{q/11}$ -Proteinbindung. (siehe Kap. 3.3.1) Durch Vergleich mit Schilddrüsenzellen, welche den

wildtypischen TSHR exprimierten, konnten Gene im cDNA-Microarray detektiert werden, die in Zellen mit intakter  $G_{q/11}$ -Kopplung des TSHR höher exprimiert waren und deren TSHR-abhängige Regulation daher potentiell über diesen Signalweg erfolgte. Eine Proteinfamilie, welche durch diesen Signalweg aktiviert zu werden schien, waren die MT (Novak *et al.*, 2005).

Folgende Fragen stellten sich nun: Werden MT in Schilddrüsenzellen tatsächlich TSH abhängig reguliert, und ist diese MT-Aktivierung  $G_{q/11}$ -abhängig? Verändert sich die MT-Expression in Abhängigkeit von der Dauer der TSH-Stimulation und der Höhe der verwendeten TSH-Konzentration? Kann man nach Aktivierung der MT-Transkription ein MT-Protein vermehrt in den Zellen nachweisen? Können weitere Effektormoleküle, welche in  $G_{q/11}$ -getriggerten Signalkaskaden eine Rolle spielen, detektiert werden?

### **6.1. Expression von MT in der Schilddrüse**

In dem vorgestellten Experiment von Novak *et al.* zeigte sich eine verminderte Expression von MT in Schilddrüsenzellen, bei denen der TSHR nicht in der Lage ist das  $G_{q/11}$ -Protein zu binden (FTC-133 Y601H). Die Methode des Microarrays diente hier lediglich als „Screening“-Untersuchung. Deshalb wurde in dieser Arbeit nun als zweite, unabhängige Methode die Real-Time detection PCR (RTD-PCR) herangezogen, um genauere Aussagen über die Expression von MT in FTC-133 Zellen treffen zu können. Auf diese Art und Weise wurde sowohl eine konzentrations- und zeitabhängige Untersuchung als auch ein Vergleich der Basalwerte ermöglicht.

Kritisch in diesen Untersuchungen ist zu betrachten, dass die Schilddrüsenkarzinomzellen jeweils mit supraphysiologischen Dosen von TSH stimuliert worden waren (25 mU/ml bis 100 mU/ml). In vivo liegt die TSH-Konzentration im Plasma gesunder Patienten bei 0,3 bis 3,5 mU/l (Renz-Polster & Aries, 2004). Im Modell müssen für ähnliche Zellantworten in vitro höhere TSH-Konzentrationen gewählt werden. So zeigen die Ergebnisse von Pain *et al.*, dass die Sensitivität in vitro gehaltener Schilddrüsenzellen generell niedriger ist als die Sensitivität von Thyreozyten im physiologischen Kontext eines Gesamtorganismus (Pain, 1975).

### **6.1.1. Transkriptionelle Regulation von MT**

Die Ergebnisse aus der RTD-PCR lassen den Schluss zu, dass TSH über den TSHR die Transskription von MT-Genen zu aktivieren vermag und dass diese Aktivierung  $G_{q/11}$ -Protein abhängig reguliert wird.

Genauer betrachtet konnte hier im Experiment die Expressionssteigerung von MT1x (eine MT-Unterform (Coyle *et al.*, 2002) in FTC-133 wt nachgewiesen werden. Diese Zellen, welche die Fähigkeit besitzen  $G_{q/11}$ -Protein abhängige Signalwege zu aktivieren (Allgeier *et al.*, 1994; Laugwitz *et al.*, 1996), reagierten über die Zeit mit einer vermehrten Synthese von MT1x-RNA. Eine solche Expressionssteigerung von MT1x lag im Vergleich dazu bei der Zelllinie FTC-133 Y601H nicht vor.

Allgemein betrachtet kann man sich verschiedene Mechanismen vorstellen, welche ausgehend von einem G-Protein koppelnden Rezeptor eine Induktion von Metallothioninen bedingen. Einmal ist eine MT-Induktion über das cAMP response element binding protein (CREB) bei Leberzellen von Ratten bekannt (Cousins *et al.*, 1986; Cousins *et al.*, 1987). Dieser Signalweg zur Aktivierung von MT kann beim humanen TSHR jedoch ausgeschlossen werden, da man in dieser Arbeit in den FTC-133 Y601H Zellen trotz intakten  $G_s$ /cAMP-abhängigen Signalweg keinerlei MT-Expressionsanstieg verzeichnen konnte. In Zukunft könnte jedoch die genauere Untersuchung des CREB-Proteins und seine Aktivierung von Interesse sein, da ein Ausfall dessen nach Nguyen *et al.* eine Hypothyreose nach sich zieht (Nguyen *et al.*, 2000). Desweiteren beschreiben Liu *et al.* einen MAPK-abhängigen (mitogen-activated protein kinase, ERK1/2) Signalweg, welcher MT induziert (Liu *et al.*, 2007b). Auch dieser Signalweg kann für die MT-Aktivierung keine Rolle spielen, da bei der FTC-133 Y601H Zelllinie der  $G_{13}$ -Protein-gekoppelter Signalweg intakt ist. Und genau dieser Signalweg ist nach Büch *et al.* entscheidend für die MAPK-Aktivierung (Buch *et al.*, 2008).

Da also die beiden Zelllinien FTC133 wt und FTC133 Y601H sich lediglich in ihrer Fähigkeit unterscheiden das  $G_{q/11}$ -Protein zu binden (Arseven *et al.*, 2000), kann man schlussfolgern, dass hier ein  $G_{q/11}$ -Protein abhängiger Signalweg für die Transkriptionskontrolle von MT verantwortlich ist.

Zusätzlich zeigte sich bei einer direkten, TSH-unabhängigen Stimulation der PKC eine Steigerung der MT1x-Expression, während TSH-Stimulierte Proben, welche mit einem PKC-Inhibitor (Bisindolylmaleinimide II) inkubiert worden waren, mit keinerlei MT1x-Expressionssteigerung reagierten. Diese Ergebnisse untermauern auf der einen Seite die Annahme, dass die MT1x-Transskription  $G_{q/11}$ -Protein abhängig reguliert wird. Auf der

anderen Seite erhält man die Erkenntnis, dass die PKC in FTC-133 wt Zellen bei der Transskriptionsaktivierung von MT eine Rolle spielt. Diese Schlussfolgerung passt zu Ergebnissen von Saydam et al., welche eine Beteiligung der PKC bei der Expression von MT in HEK293-Zellen („human embryonic kidney cells“) aufzeigen konnten. (Saydam *et al.*, 2002) (siehe Abbildung 34).

### **6.1.2. Translationelle Regulation von MT**

Nach dem erfolgreichen Nachweis von MT-mRNA in Schilddrüsenzellen durch TSH-Stimulation, stellte sich nun die Frage, ob die Zellen neben der vermehrten Produktion von mRNA auch vermehrt MT-Proteine translatieren. Mit einem MT-spezifischen Antikörper konnte sowohl im Western-Blot als auch durch die Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass FTC-133 wt Zellen auf TSH-Stimulation mit einer erhöhten Produktion von MT reagierten. Eine solche verstärkte Translation konnte in FTC-133 Y601H Zellen nicht gezeigt werden. In einem FTC-unabhängigen Zellsystem (SD-191; siehe Kap. 5.4) konnten die Ergebnisse von den FTC-133 wt Zellen reproduziert werden. So kann man davon ausgehen, dass TSH am TSHR über einen  $G_{q/11}$ -abhängigen Signalweg die Translation von MT zu induzieren vermag; eine Erkenntnis, welche so vorher unbekannt war.

Liu et al. konnten 2007 zeigen, dass in anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen die MT-Expression unter anderem Kalziumabhängig reguliert wird (Liu *et al.*, 2007a). So kann man zusammenfassen, dass MT in verschiedenen Schilddrüsenzellmodellen mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden eine breite Rolle spielen: angefangen bei primären Thyreozyten (SD-191) über differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (FTC-133) bis hin zu anaplastischen Karzinomen (Liu *et al.*, 2007a). Es stellt sich die Frage, welche Funktionen MT in der Schilddrüse übernehmen können.



## **6.2. MT und oxidativer Stress in der Schilddrüse**

Die Expressionshöhe von MT in menschlichen Zellen steigt typischerweise an, wenn diese unter vermehrtem molekularen Stress stehen (Kagi, 1991). Stressoren können hier neben erhöhten Metallionen-Konzentrationen auch Infektionen, Bestrahlungen, Entzündungen oder oxidativer Stress sein (Sato & Bremner, 1993; Coyle *et al.*, 2002; Satoh, 2007), wobei MT dabei eine protektive Funktion zugeschrieben wird (Suntres *et al.*, 2006). Die aktivierte menschliche Schilddrüsenzelle steht durch ihre hohe Peroxidaseaktivität vor allem unter oxidativem Stress (Klinke & Silbernagel, 2005). Somit wäre eine Koaktivierung von Metallothioninen sinnvoll, da sie reduzierend wirken können (Sato & Bremner, 1993).

Die Schilddrüsenhormonsynthese ist ein komplexer, durch den TSHR gesteuerter Mechanismus, welcher durch Bildung von  $H_2O_2$  die Schilddrüsenzelle unter oxidativen Stress setzt. Innerhalb dieses Mechanismus werden Iodid-Ionen vom Blut in den apikalen Teil der Schilddrüsenzelle transportiert, wo sie mit Hilfe der Thyroperoxidase (TPO) an Tyrosinreste gebunden werden (Dunn *et al.*, 2001). Die TPO ist ein 933 Aminosäuren großes, 103 kDa schweres, in der apikalen Membran verankertes HÄM-Glykoprotein, welches Thyreoglobulin (Tg) und  $H_2O_2$  für die Iodierung von Tyrosin benötigt (Kimura *et al.*, 1987; Ruf *et al.*, 2006). Wasserstoffperoxid wird in Schilddrüsenzellen von der Dualperoxidase (Duox) an der apikalen Zellmembranseite bereitgestellt (De Deken *et al.*, 2000; Edens *et al.*, 2001). Die Duox, welche große Ähnlichkeit mit der TPO aufweist, benötigt hierfür Kalzium und NADPH (Ruf & Carayon, 2006). Obwohl  $H_2O_2$  essentiell für die Iodierung von den an Tg gebundenen Tyrosinresten ist, ist es gleichzeitig toxisch für die Zelle. Somit müssen antioxidativ wirkende Moleküle in der Schilddrüsenzelle eine besondere Rolle spielen (Dunn & Dunn, 2001). So wirkt Glutathion durch seine Disulfidbrückenbildung reduktiv und hemmt außerdem durch die Kontrolle der Verfügbarkeit von  $H_2O_2$  die Iodierung von Tyrosin (Ekholm *et al.*, 1997). An dieser Stelle ist auch die selenhaltige Thioredoxin-Reduktase zu nennen, welche auch eine bedeutende Funktion in der Detoxifikation von freien Radikalen hat (Howie *et al.*, 1998). TSH steuert die meisten Aspekte dieses Iodid-Metabolismus. So wird die Produktion von Tg, TPO und von Iodidtransportern über Transkriptionsfaktoren gesteuert (TTF-1, TTF-2, Pax-8), welche  $G_s$ -abhängig vom TSHR reguliert werden (Dunn & Dunn, 2001) (Dunn, 2001; Williams & Larsen, 2003). Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase (GSH-Px), welche als Schutzmolekül gegenüber den  $G_s$ -aktivierten Mechanismen der Iodifikation (Williams & Larsen, 2003) verstanden werden muss, kann ebenfalls über G-Protein koppelnde Rezeptoren (wie den TSHR) gesteuert werden.

So konnten Howie et al. nachweisen, dass ein  $\text{Ca}^{2+}/\text{IP}_3$ -abhängiger Signalweg des TSHR verantwortlich ist für die verringerte Sekretion der GSH-Px in den Extrazellulärraum. Dies bewirkt einerseits einen verbesserten Schutz vor intrazellulärem Wasserstoffperoxyd, da hier nun höhere GSH-Px Konzentrationen auftreten, und andererseits eine verringerte Entgiftung von extrazellulärem  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Howie *et al.*, 1998). Somit führt jener Mechanismus sogar zu einer effizienteren luminären, bzw. extrazellulären Schilddrüsenhormonsynthese. Also ist es vorstellbar, dass der TSHR über verschiedene G-Proteine ( $\text{G}_s$  und  $\text{G}_{q/11}$ ) Mechanismen, die zur Radikalbildung führen, und deren Gegenmechanismen gleichzeitig aktiviert, um Thyreozyten vor zu hohem oxidativen Stress zu schützen (Karbownik *et al.*, 2003).

Auch MT haben unter oxidativen Bedingungen die Fähigkeit, durch ihre Cysteinreste (mindestens 20) Reduktionsäquivalente zu bilden und so reaktive Sauerstoff-Spezies (reactive oxygen species, ROS) zu vermindern (Suntres *et al.*, 1990; Maret, 2000). Dabei werden die im Thiolatcluster gebundenen Metallionen (meistens Zink) freigesetzt und verursachen somit einen Zink-Konzentrationsanstieg in der Zelle (Cai *et al.*, 1998; Casero *et al.*, 2004). In Zellen befindliches Zink wirkt selbst zusätzlich als Antioxidans, indem es Sulfhydrylgruppen vor Oxidation schützt und die Bildung von ROS durch Übergangsmetalle verhindert (Bray *et al.*, 1990; Powell, 2000). Außerdem dient Zink als Kofaktor für zahlreiche Transkriptionsfaktoren bei ihrer Bindung an die DNA, wie zum Beispiel für Glutathion (Andrews, 2001). Einen engen Zusammenhang zwischen MT und Glutathion konnten auch Maret et al. nachweisen, indem sie durch Erhöhung von oxidiertem Glutathion eine Zinkfreisetzung in MT initiierten (Maret, 1994). So kann man MT außerdem als molekularen Sensor deuten, der als Reaktion auf oxidativen Stress Gegenmechanismen aktiviert.

### **6.2.1. Regulation von MT**

Haq et al. fassten 2003 zusammen, dass intrazellulär-oxidativer Stress auf drei verschiedene Art und Weisen eine Induktion von MT bewirken kann (Abbildung 41) (Palmiter, 1987; Haq *et al.*, 2003).

Als erstes können ROS direkt auf die Transkription von MT Einfluss nehmen. Im MT1 Promoter der Maus wurde erstmals ein sog. antioxidant response element (ARE) detektiert, welcher auf intrazelluläres Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder redoxaktivierende Xenobiotika mit einer Transkriptionssteigerung von MT reagiert (Andrews, 2000) (Jaiswal, 1994). Als Vermittler zwischen den freien Radikalen und dem ARE tritt der bZIP Transkriptionsfaktor „NF-E2 related factor 2“ (Nrf-2) in Erscheinung (Nguyen *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2005).

Mittlerweile wurden weitere AREs in verschiedensten MT-Promotern gefunden (Dalton *et al.*, 1994; Andrews, 2000).

Eine zweite Möglichkeit der Induktion von MT durch oxidativen Stress ist ein durch die Freisetzung von Zink vermittelter Signalweg. Metallregulierende Proteine wie MT setzen unter oxidativen Bedingungen wie oben beschrieben Zink frei (Sato & Bremner, 1993). Zink selbst ist Kofaktor bei der Bindung vom metal „response element-binding transcription factor-1“ (MTF-1) mit seinem „metal response element“ (MRE) in der Promoterregion von verschiedenen Genen (Westin *et al.*, 1988; Heuchel *et al.*, 1994). MTF-1 ist hierbei ein Zink-Finger Transkriptionsfaktor (benötigt 3 Zinkmoleküle) der Familie Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> (Andrews, 2000). Erhöhte Zinkkonzentrationen vermitteln somit eine verbesserte Bindung von MTF-1 an MRE und damit indirekt eine gesteigerte Gen-Transkription (Bittel *et al.*, 1998; Haq *et al.*, 2003). Auf diese Weise beeinflusst MTF-1 u.a. die Transkription vom Zink-Transporter-1 (ZnT1), der gammaGCShc („γ-glutamylcystein synthetase heavy chain“) und eben auch von MT (Andrews, 2001; Otsuka *et al.*, 2007); denn MREs wurden vermehrt in Promotorregionen von verschiedenen MT gefunden (Stuart *et al.*, 1985).

Eine dritte und letzte Möglichkeit der MT-Induktion scheint die Phosphorylierung des MTF-1 zu sein. So wird die Phosphorylierung des MTF-1 durch einen komplexen Signalweg gesteuert, welcher die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), die c-jun N-terminale Kinase (JNK), die Tyrosinkinase, die Caseinkinase 2, Kalziumsignale und interessanterweise die PKC beinhaltet (LaRochelle *et al.*, 2001) und u.a. durch oxidativen Stress ausgelöst werden kann (Abbildung 41) (Saydam *et al.*, 2002). LaRochelle *et al.* konnten zeigen, dass eine Inhibition der MTF-1-Phosphorylierung eine verminderte MT-Transkription nach sich zieht (LaRochelle *et al.*, 2001). Somit ist es auch vorstellbar, dass ein Rezeptor-vermittelter Signalweg, welcher die PKC aktiviert, eine Phosphorylierung von MTF-1 zur Folge hat.

Solch eine Phosphorylierung von MTF-1 durch die PKC, wie evtl. beim G<sub>q/11</sub>-Protein gesteuerten Signalweg des TSHR, wäre dann ein ROS-unabhängiger Weg MT zu induzieren (Abbildung 41). Ungeklärt ist jedoch, welchen Vorteil solch eine G<sub>q/11</sub>-vermittelte MT-Aktivierung der Schilddrüse bringen würde.

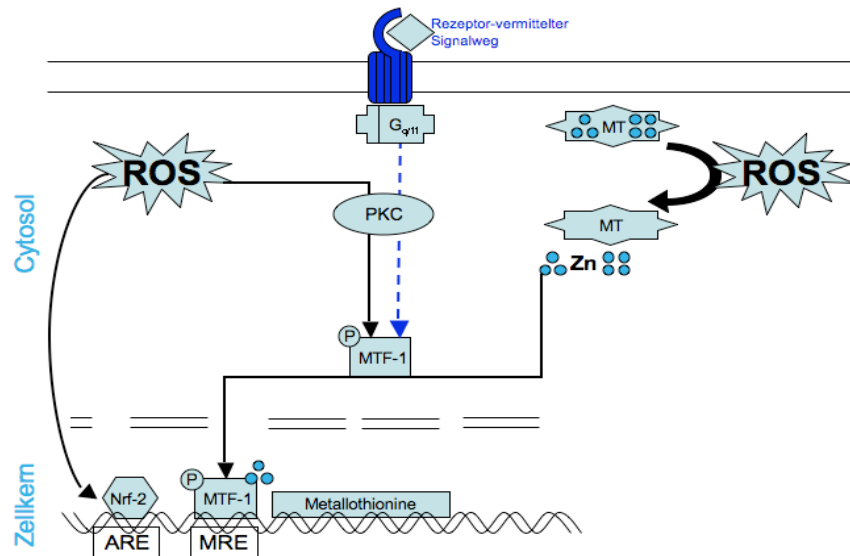


Abbildung 41: Schaubild zur möglichen Metallothioninaktivierung durch oxidativen Stress, inkl. Zink-Freisetzung durch ROS (ARE, antioxidant response element; MT, MT; MRE, metal response element; MTF-1, metal response element-binding transcription factor-1; Nrf-2, NF-E2 related factor 2; PKC, Proteinkinase C; ROS, reactive oxygen species; Zn, Zink)

So könnte man sich vorstellen, dass parallel zu der G<sub>s</sub>-gesteuerten Induktion der Iodierung von Tyrosinresten, welche ROS erzeugt, auch MT in Schilddrüsenzellen induziert werden. MT wirken wie oben beschrieben u.a. auch antioxidativ. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass solch eine Induktion von MT tatsächlich vom TSHR gesteuert wird und dass diese Induktion vom G<sub>q/11</sub>-Protein abhängig ist. So würden vom TSHR Mechanismus und Gegenmechanismus der ROS Bildung gleichzeitig über verschiedene G-Proteine reguliert. Entsprechend diesem Modell wird die Iodifikation, welche als Nebenprodukt ROS entstehen lässt, über das G<sub>s</sub>-Protein reguliert. Der dazugehörige Gegenmechanismus, der über die Aktivierung und Induktion von MT ROS eliminiert, wird G<sub>q/11</sub>-abhängig gesteuert. Der für die MT-Induktion zugrunde liegende Signalweg enthält, wie hier in dieser Arbeit nachgewiesen, u.a. die PKC. Folglich kann man sich vorstellen, dass der TSHR über das G<sub>q/11</sub>-Protein und die PKC, sowie später durch die Phosphorylierung des MTF-1 eine verstärkte Transkription des MT-Gens initiiert (Abbildung 41). Eine solche Induktion wäre in dieser Situation für die Schilddrüsenzelle metabolisch sinnvoll.

Fraglich ist nun jedoch wie genau die Phosphorylierung des MTF-1 bewerkstelligt wird, ob also die PKC das MTF-1 direkt phosphoryliert. Außerdem ist es ungeklärt, ob dieser TSHR-abhängige Mechanismus ausreicht, um eine MT-Induktion zu bewirken, oder ob es weitere Signalwege gibt, die ausgehend vom TSHR über das G<sub>q/11</sub>-Protein (und der PKC) MT induzieren können. Ein möglicher Signalweg hierfür wäre der Janus Kinase/signal transducers

and activators of transkription (JAK/STAT)-Pathway, welcher in der Literatur bereits in Zusammenhang mit dem TSHR, bzw. MT gesetzt wurde (Lee *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002).

### 6.3. Abhängigkeit der MT-Induktion vom JAK/STAT-Pathway

Bei zahlreichen Botenstoffen spielt der Janus Kinase / signal transducers and activators of transkription (JAK/STAT) - Signalweg eine wichtige Rolle, um den Zellen Differenzierungs- oder Wachstumssignale zu übermitteln (siehe auch Kap. 5.3).

Für eine Zellaktivierung können z.B. Cytokine (INFs, IL-2, IL-3, IL-5, u.v.m.) an zwei JAK-assoziierten (Janus family tyrosine kinases) Cytokinrezeptoren binden, wodurch diese dimerisieren und auf diese Weise aktiviert werden. Die JAK phosphoryliert daraufhin STAT-Proteine an einem C-Terminus nahem Tyrosinrest. STATs (Signal transducers and activators of transkription) sind schlafende Transkriptionsfaktoren im Cytosol, welche durch Kinasen wie JAK oder auch ERK1/2 (eine mitogen-activated protein kinase, MAPK) aktiviert werden können (Rawlings *et al.*, 2004). Durch die Phosphorylierung sind die STAT in der Lage zu dimerisieren, und gelangen in dieser Form in den Zellkern, wo sie regulatorisch auf die Transkription von Genen wirken (Abbildung 42) (Aaronson *et al.*, 2002; Kisseleva *et al.*, 2002). Für diese Translokation und später für die Transkriptionsaktivierung sind weitere Kofaktoren von Bedeutung, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

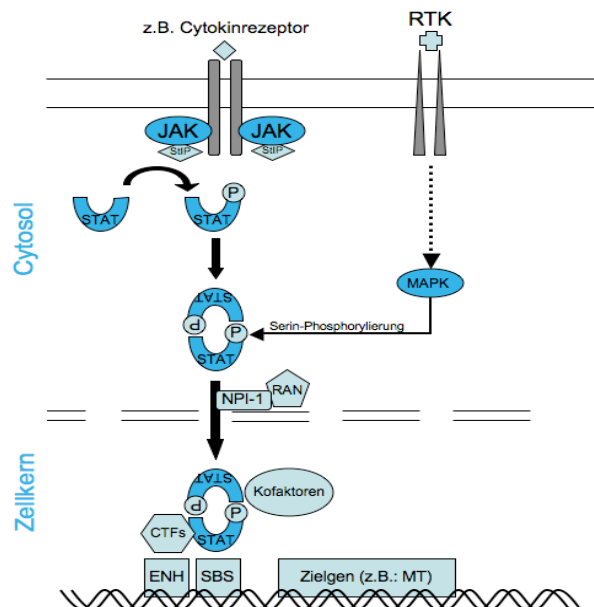


Abbildung 42: JAK/STAT-Signalweg (Abkürzungen: CTFs, cooperating transcription factors; ENH, Enhancer; JAK, Janus Kinase (just another kinase); MAPK (ERK1/2), mitogen-activated protein kinase; MT, Matallothionin; NPI-1, nucleoprotein interactor 1 (importin  $\alpha$ -5); RAN, Ras-related nuclear protein; RTK, receptor tyrosine kinase; StIP, STAT-interacting protein; SBS, STAT-binding site; STAT, Signal transducers and activators of transkription)

Im Säugetier sind vier verschiedenen JAKs identifiziert worden (JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2) (Leonard *et al.*, 1998). Sie haben in der Regel ein Molekulargewicht von 120-140 kDa, und sind klassischerweise an Cytokin- und Wachstumshormon-Rezeptoren gekoppelt. Sie sind in der Lage, wie oben beschrieben, STAT-Proteine zu phosphorylieren. Dies geschieht mit Hilfe von Adapterproteinen wie z.B. StIP (stat-interacting protein), welches in der Lage ist, an JAKs und unphosphorylierte STAT-Proteine gleichzeitig zu binden (Imada *et al.*, 2000) (Abbildung 42).

Mit einer Molekülmasse von 90 bis 110 kDa sind bis heute fünf verschiedene STATs beschrieben (STAT 1-5) (Horvath *et al.*, 1997). Obwohl die Gene der STATs auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, besitzt jedes STAT-Molekül drei identische Regionen, welche für die Aufgaben der STATs essentiell sind (Abbildung 43). Mit ihrer SH2-Domäne agieren sie mit dem Rezeptor und Adaptermolekülen, später agiert die SH2-Domäne auch mit dem phosphorylierten Tyrosinrest eines anderen STAT-Moleküls. So können sich STAT-Dimere zwischen dem phosphorylierten Tyrosinrest des einen und der SH2-Domäne des anderen STAT ausbilden. Als Dimer gelangt das STAT-Protein in den Zellkern, wo es sich mit der DNA-bindenden Domäne zielgerichtet an DNA-Abschnitte anlagert, um mit Hilfe der oligomerisierenden-Domäne die Transkription von Genen einzuleiten (Abbildung 42). Die Translokation der STAT-Dimeren in den Zellkern wird durch Importin  $\alpha$ -5 (bzw. nukleoprotein interactor 1) und dem RAN (Ras-related nuclear protein) nuclear import pathway unterstützt. Im Zellkern angekommen bildet sich ein Komplex aus STAT-Dimer, CTFs (cooperating transcription factors, wie p48, Sp1, Jun, Fos, GR) und anderen Kofaktoren (z.B.: p300/CBP, BRCA1, Nmi-1). Nach der Anlagerung der CTFs an den Enhancer und des STAT-Dimers an die SBS (STAT binding site) des Zielgens, z.B eines Metallothionins, wird die Transkription initiiert (O'Shea *et al.*, 2002; Rawlings *et al.*, 2004).

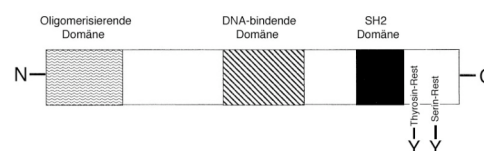


Abbildung 43: Struktur von STAT-Proteinen; an dem Tyrosinrest werden die STATs von der JAK, am Serin-Rest von der MAPK phosphoryliert; modifiziert nach Imada (Imada & Leonard, 2000)

Der JAK/STAT-Signalweg ist relativ einfach strukturiert in seiner Theorie, wird jedoch verkompliziert durch die Beeinflussung durch andere Signalwege. So interagiert der Signalweg der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK, z.B. EGFR und PDGFR<sup>6</sup>) an zwei Stellen mit dem JAK/STAT-Kaskade. Auf der einen Seite hat die RTK die Fähigkeit, STATs selbst am Tyrosinrest zu phosphorylieren und so zu aktivieren. Auf der anderen Seite phosphoryliert die Mitogen-activated protein kinase (MAPK) innerhalb des Signalwegs der RTK die STATs an einem Serinrest (Abbildung 42, Abbildung 43)(Sellers *et al.*, 1999). Auch wenn diese Phosphorylierung nicht direkt notwendig für die Aktivierung der STAT ist, erhöht sie die Wahrscheinlichkeit der STAT als Transkriptionsfaktor zu agieren (Shuai, 2000; Rawlings *et al.*, 2004).

STAT-Proteine werden also in Zellen auf ganz unterschiedliche Art und Weise aktiviert (u.a. JAK, RTK, MAPK, RAS, PI3K, PKC, und PKA) (Weber-Nordt *et al.*, 1998). Wie in dieser Arbeit gezeigt, lässt eine verminderte Grundaktivität und schwächere Aktivierbarkeit in der FTC-133 Y601H Zelllinie vermuten, dass durch die Unfähigkeit, G<sub>q/11</sub>-Proteine zu aktivieren, die Zelle auch ein gewisses Maß an Potenz verloren hat, STAT-Proteine zu phosphorylieren (siehe Kap. 5.3). Dies harmoniert mit der Vorstellung, dass STAT-Proteine bei der Induktion von MT eine Rolle spielen (Lee *et al.*, 1999; Oshima *et al.*, 2005), wobei genau diese Induktion von MT bei FTC-133 Y601H nicht nachweisbar war (Abbildung 35, Abbildung 44). Es ist jedoch nicht vorstellbar, dass die STAT-Aktivierung eine notwendige Bedingung für die MT-Induktion in FTC-133 ist. In FTC-133 Y601H ist nämlich eine gewisse STAT-Aktivierbarkeit nachweisbar, obwohl keinerlei MT-Induktion gefunden werden konnte.

---

<sup>6</sup> EGFR, epidermal growth factor receptor; PDGF, platelet-derived growth factor

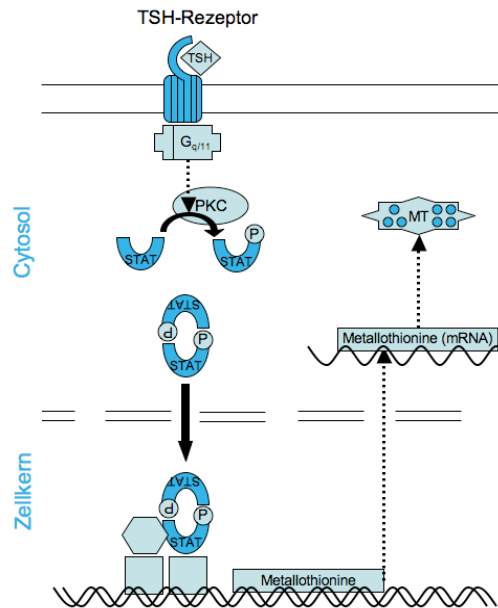


Abbildung 44: Schaubild zur Metallothioninaktivierung durch TSH in Schilddrüsenzellen, inkl. Translation von MT-mRNA zum MT-Protein und STAT-Aktivierung (PKC, Proteinkinase C; STAT, Signal transducers and activators of transcription; TSH, Thyroid-stimulating hormone)

Zu diskutieren sind nun weitere mögliche Effektorfunktionen des G<sub>q/11</sub>-Proteins im Rahmen der TSHR-vermittelten Signaltransduktion, welche zusätzlich notwendig für eine MT-Induktion sind. In dieser Arbeit wurde bereits der Transkriptionsfaktor MTF-1 erwähnt, welcher in der MT-Induktion eine wichtige Rolle spielen könnte, so wie es von LaRoche et al. für verschiedene Zellen gezeigt wurde (LaRoche *et al.*, 2001). In dieser Arbeit konnte durch PMA eine eindeutige MT-Transkription nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis würde im Einklang mit der Vorstellung stehen, dass die PKC auf der einen Seite den JAK/STAT-Signalweg aktiviert und auf der anderen Seite zu einer Phosphorylierung des MTF-1 führt. Beide Signalwege können schließlich Induktoren der MT-Gene sein (siehe 6.2.1 & 6.3). Jedenfalls wäre es nun von Interesse, den Transkriptionsfaktor MTF-1 innerhalb der Signalkaskade des TSHR zu beschreiben. Und zwar, wie MTF-1 angefangen mit der TSH-Stimulation des TSHR, über das G<sub>q/11</sub>-Protein und der PKC schließlich für eine MT-Induktion verantwortlich ist. Hier wäre ein möglicher Ausgangspunkt für weitere Forschung.



### 6.4. Ausblick

Neben der weiteren Abklärung verschiedener Moleküle und Mechanismen, welche vom TSHR ausgehend MT induzieren, sind vor allem die Aufgaben der MT in Schilddrüsenzellen von Interesse. So sind MT ein möglicher Schutzfaktor vor oxidativem Stress. Eine in diesem Zusammenhang zu klärende Frage wäre daher, ob ein exogen herbeigeführter oder endogen auftretender Anstieg an ROS in Schilddrüsenzellen eine erhöhte Expression von MT nach sich zöge. Eine solche ROS-Erhöhung könnte man beispielsweise mit direkter Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder mit einem Protein erzeugen, welches durch Licht angeregt  $\text{H}_2\text{O}_2$  produziert (KillerRed; Evrogen Moskau).

Eine weiteres Forschungsvorhaben könnte sein, zu klären, in inwieweit eine erhöhte Expression von Metallothioninen die betroffene Zelle resistenter gegenüber oxidativem Stress oder Zellstress anderer Art macht. So könnte man untersuchen, wie lange Zellen mit unterschiedlicher MT-Expressionsstärke ROS Widerstand leisten, bevor sie in Apoptose gehen. Oder man kann ein Protein (HyPer; Evrogen Moskau) in die Zellen bringen, welches als Fluoreszenzindikator für  $\text{H}_2\text{O}_2$  fungiert. So könnte man unterschiedliche Konzentrationen von intrazellulärem Wasserstoffperoxyd detektieren.

Schließlich könnte man dem Zusammenhang von MT und der TPO weiter auf den Grund gehen. Eszlinger et al. konnten nämlich 2006 zeigen, dass in verschiedenen Schilddrüsenzelllinien (Schilddrüsenzellen aus autonomen Knoten, bzw. aus sog. „kalten“ Knoten) MT und die TPO ähnliche Expressionsstärken aufwiesen. Diese Tatsache ist metabolisch betrachtet interessant, da die TPO in Schilddrüsenzellen einer der entscheidenden molekularen Faktoren für die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist (Ruf & Carayon, 2006), welches MT mit Glutathion zusammen reduzieren können (Ekholm & Bjorkman, 1997; Maret, 2000). Nun wurden im Vergleich zwischen den Zelllinien FTC-133 wt und FTC-133 Y601H im Microarray analoge Expressionsunterschiede der Gene MT und TPO gefunden (Novak & Büch, 2005). Fraglich ist nun, ob auch beispielsweise die Aktivität der TPO die Expression von MT beeinflussen kann. Dies könnte man mit einer FTC-Zelllinie mit funktionell inaktiver TPO untersuchen, welche von der Arbeitsgruppe Biebermann et. al. bereitgestellt werden kann.

## 7. Literatur

- AARONSON, D. S. & HORVATH, C. M. (2002). A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**, 1653-5.
- ABELL, A. N. & SEGALOFF, D. L. (1997). Evidence for the direct involvement of transmembrane region 6 of the lutropin/choriogonadotropin receptor in activating Gs. *J Biol Chem* **272**, 14586-91.
- ALBERTS, B. (2002). *Molecular biology of the cell*, 4. edition. Garland Science, New York, NY.
- ALLGEIER, A., LAUGWITZ, K. L., VAN SANDE, J., SCHULTZ, G. & DUMONT, J. E. (1997). Multiple G-protein coupling of the dog thyrotropin receptor. *Mol Cell Endocrinol* **127**, 81-90.
- ALLGEIER, A., OFFERMANN, S., VAN SANDE, J., SPICHER, K., SCHULTZ, G. & DUMONT, J. E. (1994). The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *J Biol Chem* **269**, 13733-5.
- ANDREWS, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* **59**, 95-104.
- ANDREWS, G. K. (2001). Cellular zinc sensors: MTF-1 regulation of gene expression. *Biometals* **14**, 223-37.
- ANDREWS, G. K. & ADAMSON, E. D. (1987). Butyrate selectively activates the metallothionein gene in teratocarcinoma cells and induces hypersensitivity to metal induction. *Nucleic Acids Res* **15**, 5461-75.
- ARSEVEN, O. K., WILKES, W. P., JAMESON, J. L. & KOPP, P. (2000). Substitutions of tyrosine 601 in the human thyrotropin receptor result in increase or loss of basal activation of the cyclic adenosine monophosphate pathway and disrupt coupling to Gq/11. *Thyroid* **10**, 3-10.
- ARTURI, F., SCARPELLI, D., COCO, A., SACCO, R., BRUNO, R., FILETTI, S. & RUSSO, D. (2003). Thyrotropin receptor mutations and thyroid hyperfunctioning adenomas ten years after their first discovery: unresolved questions. *Thyroid* **13**, 341-3.
- BERRIDGE, M. J. (1987). Inositol lipids and cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* **907**, 33-45.
- BIEBERMANN, H., SCHONEBERG, T., SCHULZ, A., KRAUSE, G., GRUTERS, A., SCHULTZ, G. & GUDERMANN, T. (1998). A conserved tyrosine residue (Y601) in transmembrane domain 5 of the human thyrotropin receptor serves as a molecular switch to determine G-protein coupling. *Faseb J* **12**, 1461-71.
- BITTEL, D., DALTON, T., SAMSON, S. L., GEDAMU, L. & ANDREWS, G. K. (1998). The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals. *J Biol Chem* **273**, 7127-33.
- BOSSIS, I., VOUTETAKIS, A., BEI, T., SANDRINI, F., GRIFFIN, K. J. & STRATAKIS, C. A. (2004). Protein kinase A and its role in human neoplasia: the Carney complex paradigm. *Endocr Relat Cancer* **11**, 265-80.
- BOURNE, H. R. (1997a). How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 134-42.

- BOURNE, H. R. (1997b). Pieces of the true grail: a G protein finds its target. *Science* **278**, 1898-9.
- BRAUN, T., SCHOFIELD, P. R. & SPRENGEL, R. (1991). Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *Embo J* **10**, 1885-90.
- BRAY, T. M. & BETTGER, W. J. (1990). The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* **8**, 281-91.
- BREMNER, I., MEHRA, R. K. & SATO, M. (1987). Metallothionein in blood, bile and urine. *Experientia Suppl* **52**, 507-17.
- BUCH, T. R., BIEBERMANN, H., KALWA, H., PINKENBURG, O., HAGER, D., BARTH, H., AKTORIES, K., BREIT, A. & GUDERMANN, T. (2008). G13-dependent activation of MAPK by thyrotropin. *J Biol Chem* **283**, 20330-41.
- CAI, L., TSIAPALIS, G. & CHERIAN, M. G. (1998). Protective role of zinc-metallothionein on DNA damage in vitro by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) and ferric salts. *Chem Biol Interact* **115**, 141-51.
- CASERO, E., MARTIN-GAGO, J. A., PARIENTE, F. & LORENZO, E. (2004). Metal release in metallothioneins induced by nitric oxide: X-ray absorption spectroscopy study. *Eur Biophys J* **33**, 726-31.
- CASTAGNA, M., TAKAI, Y., KAIBUCHI, K., SANO, K., KIKKAWA, U. & NISHIZUKA, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**, 7847-51.
- CHEN, P., MUNOZ, A., NETTESHEIM, D., SHAW, C. F., 3RD & PETERING, D. H. (1996). Stoichiometry and cluster specificity of copper binding to metallothionein: homogeneous metal clusters. *Biochem J* **317** ( Pt 2), 395-402.
- CHERIAN, M. G., JAYASURYA, A. & BAY, B. H. (2003). Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* **533**, 201-9.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9.
- CLAPHAM, D. E. & NEER, E. J. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**, 167-203.
- CONKLIN, B. R. & BOURNE, H. R. (1993). Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell* **73**, 631-41.
- COUSINS, R. J. & COPPEN, D. E. (1987). Regulation of liver zinc metabolism and metallothionein by cAMP, glucagon and glucocorticoids and suppression of free radicals by zinc. *Experientia Suppl* **52**, 545-53.
- COUSINS, R. J., DUNN, M. A., LEINART, A. S., YEDINAK, K. C. & DISILVESTRO, R. A. (1986). Coordinate regulation of zinc metabolism and metallothionein gene expression in rats. *Am J Physiol* **251**, E688-94.
- COYLE, P., PHILCOX, J. C., CAREY, L. C. & ROFE, A. M. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* **59**, 627-47.
- DALTON, T., PALMITER, R. D. & ANDREWS, G. K. (1994). Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite major

- late transcription factor/antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic Acids Res* **22**, 5016-23.
- DANNEN, F. V. (2002). Schilddrüsenunterfunktion. *Grooveman* **1**, 3-4.
- DARNELL, J. E., JR. (1997). STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630-5.
- DAVIES, T., MARIANS, R. & LATIF, R. (2002). The TSH receptor reveals itself. *J Clin Invest* **110**, 161-4.
- DE DEKEN, X., WANG, D., MANY, M. C., COSTAGLIOLA, S., LIBERT, F., VASSART, G., DUMONT, J. E. & MIOT, F. (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* **275**, 23227-33.
- DERWAHL, M., HAMACHER, C., RUSSO, D., BROECKER, M., MANOLE, D., SCHATZ, H., KOPP, P. & FILETTI, S. (1996). Constitutive activation of the Gs alpha protein-adenylate cyclase pathway may not be sufficient to generate toxic thyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 1898-904.
- DUNN, J. T. (2001). Biosynthesis and secretion of thyroid hormones. *DeGroot LJ, Jameson JL (eds) Endocrinology, Philadelphia* **4**, 1290.
- DUNN, J. T. & DUNN, A. D. (2001). Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid* **11**, 407-14.
- DUPREZ, L., PARMA, J., VAN SANDE, J., ALLGEIER, A., LECLERE, J., SCHVARTZ, C., DELISLE, M. J., DECOULX, M., ORGIAZZI, J., DUMONT, J. & ET AL. (1994). Germline mutations in the thyrotropin receptor gene cause non-autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism. *Nat Genet* **7**, 396-401.
- EDENS, W. A., SHARLING, L., CHENG, G., SHAPIRA, R., KINKADE, J. M., LEE, T., EDENS, H. A., TANG, X., SULLARDS, C., FLAHERTY, D. B., BENIAN, G. M. & LAMBETH, J. D. (2001). Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol* **154**, 879-91.
- EKHOLM, R. & BJORKMAN, U. (1997). Glutathione peroxidase degrades intracellular hydrogen peroxide and thereby inhibits intracellular protein iodination in thyroid epithelium. *Endocrinology* **138**, 2871-8.
- ESZLINGER, M., KROHN, K., KRATZSCH, J., VOIGT, C. & PASCHKE, R. (2001). Growth factor expression in cold and hot thyroid nodules. *Thyroid* **11**, 125-35.
- FAN, Q. R. & HENDRICKSON, W. A. (2005). Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* **433**, 269-77.
- FARRENS, D. L., ALTENBACH, C., YANG, K., HUBBELL, W. L. & KHORANA, H. G. (1996). Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science* **274**, 768-70.
- FLIERS, E., UNMEHOPA, U. A. & ALKEMADE, A. (2006). Functional neuroanatomy of thyroid hormone feedback in the human hypothalamus and pituitary gland. *Mol Cell Endocrinol* **251**, 1-8.
- GETHER, U. (2000). Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* **21**, 90-113.

- GILMAN, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**, 615-49.
- GIUDICE, L. C. & WEINTRAUB, B. D. (1979). Evidence for conformational differences between precursor and processed forms of thyroid-stimulating hormone beta subunit. *J Biol Chem* **254**, 12679-83.
- GRASBERGER, H., VAN SANDE, J., MAHAMEED AHMAD, H. D., TENENBAUM-RAKOVER, Y. & REFETTOFF, S. (2007). A Familial TSH Receptor Mutation Provides In Vivo Evidence that the Inositol Phosphates/Ca<sup>2+</sup> Cascade Mediates TSH Action on Thyroid Hormone Synthesis. *J Clin Endocrinol Metab*.
- GROSS, B., MISRAHI, M., SAR, S. & MILGROM, E. (1991). Composite structure of the human thyrotropin receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* **177**, 679-87.
- GUDERMANN, T., KALKBRENNER, F., DIPPEL, E., LAUGWITZ, K. L. & SCHULTZ, G. (1997). Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **31**, 253-62.
- GUDERMANN, T., KALKBRENNER, F. & SCHULTZ, G. (1996). Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 429-59.
- GUDERMANN, T., NURNBERG, B. & SCHULTZ, G. (1995). Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J Mol Med* **73**, 51-63.
- GUDERMANN, T., NURWAKAGARI, P. & BEN-MENAHM, D. (2005). Hormone binding to the follicle-stimulating hormone receptor--crystal clear! *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **113**, 245-7.
- HAMER, D. H. (1986). Metallothionein. *Annu Rev Biochem* **55**, 913-51.
- HAQ, F., MAHONEY, M. & KOROPATNICK, J. (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res* **533**, 211-26.
- HARA, T., NAMBA, H., TAKAMURA, N., YANG, T. T., NAGAYAMA, Y., FUKATA, S., KUMA, K., ISHIKAWA, N., ITO, K. & YAMASHITA, S. (1999). Thyrotropin regulates c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity through two distinct signal pathways in human thyroid cells. *Endocrinology* **140**, 1724-30.
- HEDIN, K. E., DUERSON, K. & CLAPHAM, D. E. (1993). Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. *Cell Signal* **5**, 505-18.
- HEUCHEL, R., RADTKE, F., GEORGIEV, O., STARK, G., AGUET, M. & SCHAFFNER, W. (1994). The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *Embo J* **13**, 2870-5.
- HEUCHEL, R., RADTKE, F. & W., S. (1995). *Transcriptional regulation by heavy metals, exemplified at the metallothionein genes*. Birkhäuser, Boston, USA.
- HORVATH, C. M. & DARNELL, J. E. (1997). The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 233-9.
- HOWIE, A. F., ARTHUR, J. R., NICOL, F., WALKER, S. W., BEECH, S. G. & BECKETT, G. J. (1998). Identification of a 57-kilodalton selenoprotein in human thyrocytes as thioredoxin reductase and evidence that its expression is regulated through the calcium-phosphoinositol signaling pathway. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2052-8.

- HUBBARD, K. B. & HEPLER, J. R. (2006). Cell signalling diversity of the Gqalpha family of heterotrimeric G proteins. *Cell Signal* **18**, 135-50.
- HUNT, J. (2005). Understanding the genotype of follicular thyroid tumors. *Endocr Pathol* **16**, 311-21.
- IMADA, K. & LEONARD, W. J. (2000). The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* **37**, 1-11.
- IMBRA, R. J. & KARIN, M. (1987). Metallothionein gene expression is regulated by serum factors and activators of protein kinase C. *Mol Cell Biol* **7**, 1358-63.
- JAISWAL, A. K. (1994). Antioxidant response element. *Biochem Pharmacol* **48**, 439-44.
- JANSSEN, O. E., QUADBECK, B. & REFETOFF, S. (2003). Resistenz gegen TSH. *J Lab Med; Blackwell Verlag, Berlin* **27 (1/2)**, 60-66.
- KAGI, J. H. (1991). Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* **205**, 613-26.
- KAJAVA, A. V., VASSART, G. & WODAK, S. J. (1995). Modeling of the three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure* **3**, 867-77.
- KAJITA, Y., RICKARDS, C. R., BUCKLAND, P. R., HOWELLS, R. D. & REES SMITH, B. (1985). Analysis of thyrotropin receptors by photoaffinity labelling. Orientation of receptor subunits in the cell membrane. *Biochem J* **227**, 413-20.
- KANG, K. W., LEE, S. J. & KIM, S. G. (2005). Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1664-73.
- KARBOWNIK, M. & LEWINSKI, A. (2003). The role of oxidative stress in physiological and pathological processes in the thyroid gland; possible involvement in pineal-thyroid interactions. *Neuro Endocrinol Lett* **24**, 293-303.
- KELLY, G. S. (2000). Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. *Altern Med Rev* **5**, 306-33.
- KIKKAWA, U., KISHIMOTO, A. & NISHIZUKA, Y. (1989). The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu Rev Biochem* **58**, 31-44.
- KIMURA, S., KOTANI, T., MCBRIDE, O. W., UMEKI, K., HIRAI, K., NAKAYAMA, T. & OHTAKI, S. (1987). Human thyroid peroxidase: complete cDNA and protein sequence, chromosome mapping, and identification of two alternately spliced mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5555-9.
- KISSELEVA, T., BHATTACHARYA, S., BRAUNSTEIN, J. & SCHINDLER, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1-24.
- KLAASSEN, C. D., LIU, J. & CHOUDHURI, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 267-94.
- KLINKE, R. & SILBERNAGEL, S. (2005). *Lehrbuch der Physiologie*, 5. Auflage edition. Thieme, Stuttgart.
- KOBE, B. & DEISENHOFER, J. (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* **19**, 415-21.
- KONDO, Y., RUSNAK, J. M., HOYT, D. G., SETTINERI, C. E., PITT, B. R. & LAZO, J. S. (1997). Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. *Mol Pharmacol* **52**, 195-201.

- KOSUGI, S., OKAJIMA, F., BAN, T., HIDAKA, A., SHENKER, A. & KOHN, L. D. (1992). Mutation of alanine 623 in the third cytoplasmic loop of the rat thyrotropin (TSH) receptor results in a loss in the phosphoinositide but not cAMP signal induced by TSH and receptor autoantibodies. *J Biol Chem* **267**, 24153-6.
- KOSUGI, S., SHENKER, A. & MORI, T. (1994). Constitutive activation of cyclic AMP but not phosphatidylinositol signaling caused by four mutations in the 6th transmembrane helix of the human thyrotropin receptor. *FEBS Lett* **356**, 291-4.
- KROLL, T. G. (2004). Molecular events in follicular thyroid tumors. *Cancer Treat Res* **122**, 85-105.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- LAROCHELLE, O., GAGNE, V., CHARRON, J., SOH, J. W. & SEGUIN, C. (2001). Phosphorylation is involved in the activation of metal-regulatory transcription factor 1 in response to metal ions. *J Biol Chem* **276**, 41879-88.
- LAUGWITZ, K. L., ALLGEIER, A., OFFERMANN, S., SPICHER, K., VAN SANDE, J., DUMONT, J. E. & SCHULTZ, G. (1996). The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 116-20.
- LEE, D. K., CARRASCO, J., HIDALGO, J. & ANDREWS, G. K. (1999). Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression. *Biochem J* **337** ( Pt 1), 59-65.
- LEONARD, W. J. & O'SHEA, J. J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* **16**, 293-322.
- LIU, Z. M., CHEN, G. G., SHUM, C. K., VLANTIS, A. C., CHERIAN, M. G., KOROPATNICK, J. & VAN HASSELT, C. A. (2007a). Induction of functional MT1 and MT2 isoforms by calcium in anaplastic thyroid carcinoma cells. *FEBS Lett* **581**, 2465-72.
- LIU, Z. M., CHEN, G. G., SHUM, C. K., VLANTIS, A. C., GEORGE CHERIAN, M., KOROPATNICK, J. & ANDREW VAN HASSELT, C. (2007b). Induction of functional MT1 and MT2 isoforms by calcium in anaplastic thyroid carcinoma cells. *FEBS Lett*.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. (2006). *Taschenlehrbuch Histologie : 10 Tabellen*, 2., komplett überarb. Aufl.. edition, Stuttgart {[u.a.] Thieme,.
- MARET, W. (1994). Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 237-41.
- MARET, W. (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr* **130**, 1455S-8S.
- MARGOSHES, M. & VALLEE, B. L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society* **79**, 4813-4814
- MILLIGAN, G., SHAH, B. H., MULLANEY, I. & GRASSIE, M. A. (1995). Biochemical approaches to examine the specificity of interactions between receptors and guanine nucleotide binding proteins. *J Recept Signal Transduct Res* **15**, 253-65.
- MISRAHI, M., GHINEA, N., SAR, S., SAUNIER, B., JOLIVET, A., LOOSFELT, H., CERUTTI, M., DEVAUCHELLE, G. & MILGROM, E. (1994). Processing of the precursors of the human

- thyroid-stimulating hormone receptor in various eukaryotic cells (human thyrocytes, transfected L cells and baculovirus-infected insect cells). *Eur J Biochem* **222**, 711-9.
- MISRAHI, M., LOOSFELT, H., ATGER, M., VU HAI, M. T., GROSS, B., MEDURI, G., JOLIVET, A. & MILGROM, E. (1992). LH and TSH receptors. A new family of G protein-coupled receptors. *Ann Biol Clin (Paris)* **50**, 229-32.
- MURAKAMI, M., KAMIYA, Y., YANAGITA, Y. & MORI, M. (1999). Gs alpha mutations in hyperfunctioning thyroid adenomas. *Arch Med Res* **30**, 514-21.
- NAGAYAMA, Y., KAUFMAN, K. D., SETO, P. & RAPOPORT, B. (1989). Molecular cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **165**, 1184-90.
- NAGAYAMA, Y. & RAPOPORT, B. (1992). The thyrotropin receptor 25 years after its discovery: new insight after its molecular cloning. *Mol Endocrinol* **6**, 145-56.
- NATH, R., KAMBADUR, R., GULATI, S., PALIWAL, V. K. & SHARMA, M. (1988). Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of metallothioneins. *Crit Rev Food Sci Nutr* **27**, 41-85.
- NEBES, V. L., DEFRANCO, D. & MORRIS, S. M., JR. (1988). Cyclic AMP induces metallothionein gene expression in rat hepatocytes but not in rat kidney. *Biochem J* **255**, 741-3.
- NEER, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-57.
- NEUMANN, S., KRAUSE, G., CHEY, S. & PASCHKE, R. (2001). A free carboxylate oxygen in the side chain of position 674 in transmembrane domain 7 is necessary for TSH receptor activation. *Mol Endocrinol* **15**, 1294-305.
- NGUYEN, L. Q., KOPP, P., MARTINSON, F., STANFIELD, K., ROTH, S. I. & JAMESON, J. L. (2000). A dominant negative CREB (cAMP response element-binding protein) isoform inhibits thyrocyte growth, thyroid-specific gene expression, differentiation, and function. *Mol Endocrinol* **14**, 1448-61.
- NGUYEN, T., SHERRATT, P. J. & PICKETT, C. B. (2003). Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 233-60.
- NIELSON, K. B. & WINGE, D. R. (1985). Independence of the domains of metallothionein in metal binding. *J Biol Chem* **260**, 8698-701.
- NISHIZUKA, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *Faseb J* **9**, 484-96.
- NOVAK, N. & BÜCH, T. R. (2005). *Diplomarbeit*.
- NUNEZ MIGUEL, R., SANDERS, J., JEFFREYS, J., DEPRAETERE, H., EVANS, M., RICHARDS, T., BLUNDELL, T. L., REES SMITH, B. & FURMANIAK, J. (2004). Analysis of the thyrotropin receptor-thyrotropin interaction by comparative modeling. *Thyroid* **14**, 991-1011.
- NUSSEY, S. S. & WHITEHEAD, S. A. (2001). *Endocrinology : an integrated approach*. Bios Scientific Publ., Oxford.
- O'SHEA, J. J., GADINA, M. & SCHREIBER, R. D. (2002). Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109 Suppl**, S121-31.



- OSHIMA, Y., FUJIO, Y., NAKANISHI, T., ITOH, N., YAMAMOTO, Y., NEGORO, S., TANAKA, K., KISHIMOTO, T., KAWASE, I. & AZUMA, J. (2005). STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc Res* **65**, 428-35.
- OTSUKA, F., OHNO, S., SUZUKI, K., TAKAHASHI, K., OHSAWA, M. & KOIZUMI, S. (2007). Mechanism of Metallothionein Gene Activation Mediated by Heavy-metal Dependent Transcription Factor MTF-1. *Yakugaku Zasshi* **127**, 675-84.
- PAIN, R. W. (1975). In vitro testing of thyroid function: a review. *Pathology* **7**, 1-12.
- PALMITER, R. D. (1987). Molecular biology of metallothionein gene expression. *Experientia Suppl* **52**, 63-80.
- PARK, E. S., KIM, H., SUH, J. M., PARK, S. J., YOU, S. H., CHUNG, H. K., LEE, K. W., KWON, O. Y., CHO, B. Y., KIM, Y. K., RO, H. K., CHUNG, J. & SHONG, M. (2000). Involvement of JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) in the thyrotropin signaling pathway. *Mol Endocrinol* **14**, 662-70.
- PARK, Y. J., PARK, E. S., KIM, M. S., KIM, T. Y., LEE, H. S., LEE, S., JANG, I. S., SHONG, M., PARK, D. J. & CHO, B. Y. (2002). Involvement of the protein kinase C pathway in thyrotropin-induced STAT3 activation in FRTL-5 thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* **194**, 77-84.
- PARMA, J., DUPREZ, L., VAN SANDE, J., HERMANS, J., ROCMANS, P., VAN VLIET, G., COSTAGLIOLA, S., RODIEN, P., DUMONT, J. E. & VASSART, G. (1997). Diversity and prevalence of somatic mutations in the thyrotropin receptor and Gs alpha genes as a cause of toxic thyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2695-701.
- PARMA, J., VAN SANDE, J., SWILLENS, S., TONACCHERA, M., DUMONT, J. & VASSART, G. (1995). Somatic mutations causing constitutive activity of the thyrotropin receptor are the major cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutations activating both the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inositol phosphate-Ca<sup>2+</sup> cascades. *Mol Endocrinol* **9**, 725-33.
- PORCELLINI, A., CIULLO, I., PANNAIN, S., FENZI, G. & AVVEDIMENTO, E. (1995). Somatic mutations in the VI transmembrane segment of the thyrotropin receptor constitutively activate cAMP signalling in thyroid hyperfunctioning adenomas. *Oncogene* **11**, 1089-93.
- POUNTNEY, D. L., FUNDEL, S. M., FALLER, P., BIRCHLER, N. E., HUNZIKER, P. & VASAK, M. (1994). Isolation, primary structures and metal binding properties of neuronal growth inhibitory factor (GIF) from bovine and equine brain. *FEBS Lett* **345**, 193-7.
- POWELL, S. R. (2000). The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* **130**, 1447S-54S.
- PROBST, W. C., SNYDER, L. A., SCHUSTER, D. I., BROSIUS, J. & SEALFON, S. C. (1992). Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* **11**, 1-20.
- RANG, H. P. (2003). *Pharmacology*, 5. edition. Churchill Livingstone, Edinburgh [u.a.].
- RAWLINGS, J. S., ROSLER, K. M. & HARRISON, D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* **117**, 1281-3.
- RAYMOND, J. R. (1995). Multiple mechanisms of receptor-G protein signaling specificity. *Am J Physiol* **269**, F141-58.

- RENZ-POLSTER, H. & ARIES, S.-P. (2004). *Lehrbuch Innere Medizin*, 3. Aufl. edition. Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.].
- RHEE, S. G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* **70**, 281-312.
- RINGEL, M. D., SAJI, M., SCHWINDINGER, W. F., SEGEV, D., ZEIGER, M. A. & LEVINE, M. A. (1998). Absence of activating mutations of the genes encoding the alpha-subunits of G11 and Gq in thyroid neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 554-9.
- ROBBINS, A. H., MCREE, D. E., WILLIAMSON, M., COLLETT, S. A., XUONG, N. H., FUREY, W. F., WANG, B. C. & STOUT, C. D. (1991a). Refined crystal structure of Cd, Zn metallothionein at 2.0 Å resolution. *J Mol Biol* **221**, 1269-93.
- ROBBINS, A. H. & STOUT, C. D. (1991b). X-ray structure of metallothionein. *Methods Enzymol* **205**, 485-502.
- ROSENBERG, D., GROUSSIN, L., JULIAN, E., PERLEMOINE, K., BERTAGNA, X. & BERTHERAT, J. (2002). Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann N Y Acad Sci* **968**, 65-74.
- RUF, J. & CARAYON, P. (2006). Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys* **445**, 269-77.
- RUSSO, D., ARTURI, F., WICKER, R., CHAZENBALK, G. D., SCHLUMBERGER, M., DUVILLARD, J. A., CAILLOU, B., MONIER, R., RAPOPORT, B., FILETTI, S. & ET AL. (1995). Genetic alterations in thyroid hyperfunctioning adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 1347-51.
- SATO, M. & BREMNER, I. (1993). Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* **14**, 325-37.
- SATOH, M. (2007). Analysis of toxicity using metallothionein knockout mice. *Yakugaku Zasshi* **127**, 709-17.
- SAYDAM, N., ADAMS, T. K., STEINER, F., SCHAFFNER, W. & FREEDMAN, J. H. (2002). Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *J Biol Chem* **277**, 20438-45.
- SCHIEBLER, T. H. (2005). *Anatomie : Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs ; mit 100 Tabellen*, 9., vollst. überarb. Aufl.. edition. Springer, Berlin [u.a.].
- SELLERS, L. A., FENIUK, W., HUMPHREY, P. P. & LAUDER, H. (1999). Activated G protein-coupled receptor induces tyrosine phosphorylation of STAT3 and agonist-selective serine phosphorylation via sustained stimulation of mitogen-activated protein kinase. Resultant effects on cell proliferation. *J Biol Chem* **274**, 16423-30.
- SHUAI, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* **19**, 2638-44.
- SILBERNAGEL, S. D., AGAMEMNON (1991). *Taschenatlas der Physiologie*, 4. überarb. Auflage edition. Thieme, Stuttgart.
- SIMON, M. I., STRATHMANN, M. P. & GAUTAM, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-8.

- SOBOTTA, J. (2005). *Atlas der Anatomie des Menschen*, 22 edition. Urban und Fischer, München.
- SPAMBALG, D., SHARIFI, N., ELISEI, R., GROSS, J. L., MEDEIROS-NETO, G. & FAGIN, J. A. (1996). Structural studies of the thyrotropin receptor and Gs alpha in human thyroid cancers: low prevalence of mutations predicts infrequent involvement in malignant transformation. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 3898-901.
- STRADER, C. D., FONG, T. M., TOTA, M. R., UNDERWOOD, D. & DIXON, R. A. (1994). Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* **63**, 101-32.
- STUART, G. W., SEARLE, P. F. & PALMITER, R. D. (1985). Identification of multiple metal regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. *Nature* **317**, 828-31.
- SUAREZ, H. G. (2000). Molecular basis of epithelial thyroid tumorigenesis. *C R Acad Sci III* **323**, 519-28.
- SUNTRES, Z. E. & LUI, E. M. (1990). Biochemical mechanism of metallothionein--carbon tetrachloride interaction in vitro. *Biochem Pharmacol* **39**, 833-40.
- SUNTRES, Z. E. & LUI, E. M. (2006). Antioxidant effect of zinc and zinc-metallothionein in the acute cytotoxicity of hydrogen peroxide in Ehrlich ascites tumour cells. *Chem Biol Interact* **162**, 11-23.
- TAKESHITA, A., NAGAYAMA, Y., YAMASHITA, S., TAKAMATSU, J., OHSAWA, N., MAESAKA, H., TACHIBANA, K., TOKUHIRO, E., ASHIZAWA, K., YOKOYAMA, N. & ET AL. (1994). Sequence analysis of the thyrotropin (TSH) receptor gene in congenital primary hypothyroidism associated with TSH unresponsiveness. *Thyroid* **4**, 255-9.
- THOMAS, D., ROZELL, T. G., LIU, X. & SEGALOFF, D. L. (1996). Mutational analyses of the extracellular domain of the full-length lutropin/choriogonadotropin receptor suggest leucine-rich repeats 1-6 are involved in hormone binding. *Mol Endocrinol* **10**, 760-8.
- TOULLEC, D., PIANETTI, P., COSTE, H., BELLEVERGUE, P., GRAND-PERRET, T., AJAKANE, M., BAUDET, V., BOISSIN, P., BOURSIER, E., LORIOLE, F. & ET AL. (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem* **266**, 15771-81.
- UCHIDA, Y., TAKIO, K., TITANI, K., IHARA, Y. & TOMONAGA, M. (1991). The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* **7**, 337-47.
- VALLAR, L. (1996). Oncogenic role of heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv* **27**, 325-38.
- VAMVAKOPOULOS, N. C. & KOURIDES, I. A. (1979). Identification of separate mRNAs coding for the alpha and beta subunits of thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3809-13.
- VASAK, M. (2005). Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol* **19**, 13-7.
- VASAK, M. & HASLER, D. W. (2000). Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 177-83.
- VASSART, G. & DUMONT, J. E. (1992). The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* **13**, 596-611.

- WEBER-NORDT, R. M., MERTELSMANN, R. & FINKE, J. (1998). The JAK-STAT pathway: signal transduction involved in proliferation, differentiation and transformation. *Leuk Lymphoma* **28**, 459-67.
- WESS, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *Faseb J* **11**, 346-54.
- WESS, J. (1998). Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* **80**, 231-64.
- WESTIN, G. & SCHAFFNER, W. (1988). A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *Embo J* **7**, 3763-70.
- WETTSCHURECK, N., LEE, E., LIBUTTI, S. K., OFFERMANN, S., ROBEY, P. G. & SPIEGEL, A. M. (2007). Parathyroid-specific double knockout of Gq and G11 alpha-subunits leads to a phenotype resembling germline knockout of the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *Mol Endocrinol* **21**, 274-80.
- WILLIAMS, R. H. & LARSEN, P. R. (2003). *Williams textbook of endocrinology*, 10. ed edition. Saunders, Philadelphia, Pa.
- WONEROW, P., NEUMANN, S., GUDERMANN, T. & PASCHKE, R. (2001). Thyrotropin receptor mutations as a tool to understand thyrotropin receptor action. *J Mol Med* **79**, 707-21.

•

## **8. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren Aumüller, Barth, Büch, Breit, Bertalanffy, Bien, Daut, Eilers, Gress, Gudermann, Gotzen, Gressner, Grzeschik, Hasilik, Hoffmann, Klenk, Klose, Kuhlmann, Koolmann, Lang, Lill, Löffler, Lorenz, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Plant, Radsak, Remschmidt, Rothmund, Schäfer, Seitz, Steiniger, Steinmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Wesemann, Wulf in Marburg;

Graewe, Van der Walt, in Kapstadt;

Constandache, Grintescu, Tulbure in Bukarest;

Winqvist, Olafson, Gehrman in Stockholm;

Anvari, Maurer in Wien;

Globisch in Schwelm.

### **9. Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Gudermann für die Möglichkeit, im Institut für Pharmakologie und Toxikologie promovieren zu können, sowie für die Möglichkeit Ergebnisse dieser Arbeit auf dem europäischen Endokrinologenkongress 2007 in Budapest vorstellen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Thomas Büch für die intensive und lehrreiche Betreuung meiner Promotion. In zahlreichen fachlich brillanten wie auch amüsanten Diskussionen habe ich Vieles von ihm lernen können. Danke!

Nicola Novak möchte ich für die Bereitstellung ihrer Ergebnisse danken, welche die Fragestellung dieser Arbeit aufgeworfen hatten.

Für die freundschaftlich geprägte und angenehme Zeit im Labor des Instituts der Pharmakologie und Toxikologie möchte ich allen Mitarbeitern/innen des Instituts danken. Namentlich seien hier (alphabetisch) erwähnt: Florian Berg, Ingrid Boekhoff, Andreas Breit, Alexander Dietrich, Marius Grzelinski, Dominik Heling, Thomas Hofmann, Beate Junk, Hermann Kalwa, Silke Kaske, Winfried Lorenz, Pascall Nurwakagari, Tanja Pfeffer-Eckel, Tim Plant, Helga Radler und Susanne Roelle. Bedanken möchte ich mich zusätzlich bei Angela Weidner für ihr Engagement bei der Korrektur dieser Arbeit.

Auch meinen Eltern Elisabeth und Ulf Bäck sowie der rumänischen Geduld meiner Freundin Ioana möchte ich danken, die wegen meiner Arbeit im Labor oft hat auf mich verzichten müssen.

## **10. Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Signalwege des TSH-Rezeptors - Gq/11-vermittelte Regulation von Metallothioninen in Schilddrüsenkarzinomzellen“ im Institut der Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Prof. Dr. T. Gudermann mit Unterstützung durch Dr. T. Büch ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 24.09.2009

Christer M. Bäck